

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y
FUNCIONALIDAD DE QUITINASAS Y 1,3- β -
GLUCANASAS INDUCIDAS
DIFERENCIALMENTE EN FRUTOS DE “ANNONA
CHERIMOLA” MILL. POR BAJAS
TEMPERATURAS Y ELEVADAS
CONCENTRACIONES DE CO₂.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Óscar Goñi Ramos

Bajo la dirección de las doctoras

María Isabel Escribano Garaizabal
Carmen Merodio Moreno

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-694-2081-2

© Óscar Goñi Ramos, 2010



Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Instituto del Frío-ICTAN
Dpto. de Ciencia y Tecnología de Productos Vegetales
c/ José Antonio Novais nº 10, CP. 28040 Madrid

En el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se ha establecido el patrón isoenzimático de quitinasas y 1,3- β -glucanasas ácidas y básicas en chirimoya y su regulación por señales del desarrollo o por estímulos relacionados con las respuestas de defensa a las bajas temperaturas o de tolerancia activada por un pretratamiento con elevadas concentraciones de CO₂. La caracterización bioquímica, cinética y funcional de las isoenzimas quitinasa inducidas diferencialmente ha revelado una alta eficiencia hidrolítica y un comportamiento sinérgico en la degradación de polímeros y quitoooligosacáridos. Asimismo, se ha establecido su funcionalidad como enzimas catalíticamente activas a bajas temperaturas o antifúngicas frente a *B. cinerea*, actuando en diferentes fases dentro de la respuesta del fruto a las bajas temperaturas de conservación. Es interesante destacar la inducción por efecto de elevadas concentraciones de CO₂ de dos nuevas proteínas, una quitinasa básica y una 1,3- β -glucanasa ácida, con una potente actividad crioprotectora y asociadas al incremento de tolerancia al daño por frío. Además de la relevancia de estas isoenzimas en el estudio de los mecanismos implicados en la adquisición de nuevas funciones biológicas no hidrolíticas o en la adaptación catalítica a bajas temperaturas, cabe señalar su potencial de aplicación en la industria química, agroalimentaria o farmacéutica.

ÓSCAR GOÑI RAMOS TESIS DOCTORAL

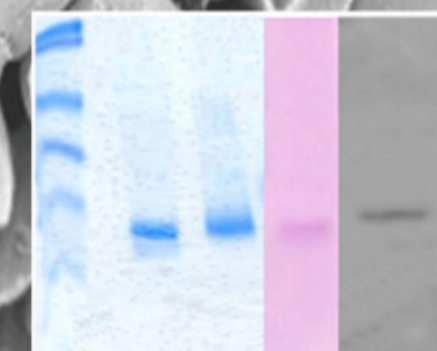
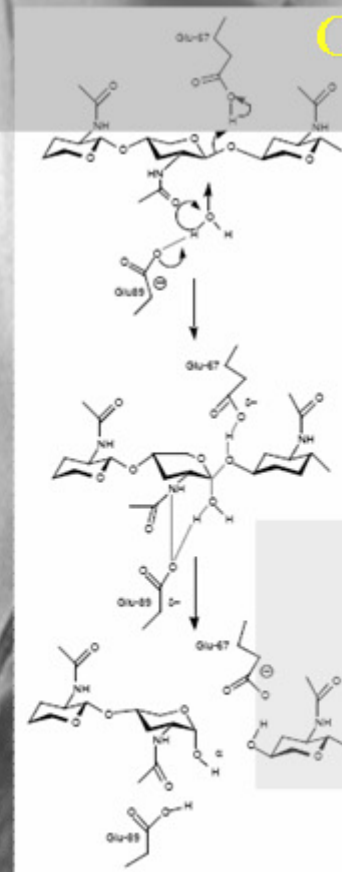
2010



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID



AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y
FUNCIONALIDAD DE QUITINASAS Y 1,3- β -
GLUCANASAS INDUCIDAS DIFERENCIALMENTE
EN FRUTOS DE *ANNONA CHERIMOLA* MILL.
POR BAJAS TEMPERATURAS Y ELEVADAS
CONCENTRACIONES DE CO₂



TESIS DOCTORAL
Óscar Goñi Ramos
MADRID, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y FUNCIONALIDAD
DE QUITINASAS Y 1,3- β -GLUCANASAS INDUCIDAS
DIFERENCIALMENTE EN FRUTOS DE *ANNONA
CHERIMOLA* MILL. POR BAJAS TEMPERATURAS Y
ELEVADAS CONCENTRACIONES DE CO₂**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Óscar Goñi Ramos

Bajo la dirección de:

Dr. María Isabel Escribano Garaizabal

Dr. Carmen Merodio Moreno

Madrid, 2010



**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS**

INSTITUTO DEL FRÍO

C/ José Antonio Novais, 10

28040, Madrid

Tlf: 91-5492300

María Isabel Escribano Garaizabal, Doctor en Biología, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas adscrito al Instituto del Frío de Madrid

CERTIFICA que:

D. Óscar Goñi Ramos, Licenciado en Química por la Universidad de Navarra, ha realizado bajo su codirección el trabajo que, con el título: **“Aislamiento, caracterización y funcionalidad de quitinasas y 1,3- β -glucanasas inducidas diferencialmente en frutos de *Annona cherimola* Mill. por bajas temperaturas y elevadas concentraciones de CO₂”,** presenta para optar al grado de Doctor en Química por la Universidad Complutense de Madrid.

Para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Madrid, a 7 de junio de 2010.

María Isabel Escribano Garaizabal



**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS**
INSTITUTO DEL FRÍO
C/ José Antonio Novais, 10
28040, Madrid
Tlf: 91-5492300

Carmen Merodio Moreno, Doctor en Biología, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas adscrito al Instituto del Frío de Madrid

CERTIFICA que:

D. Óscar Goñi Ramos, Licenciado en Química por la Universidad de Navarra, ha realizado bajo su codirección el trabajo que, con el título: **“Aislamiento, caracterización y funcionalidad de quitinasas y 1,3- β -glucanasas inducidas diferencialmente en frutos de *Annona cherimola* Mill. por bajas temperaturas y elevadas concentraciones de CO₂”,** presenta para optar al grado de Doctor en Química por la Universidad Complutense de Madrid.

Para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Madrid, a 7 de junio de 2010.

Carmen Merodio Moreno

A mis padres y a mi hermano

A Javier

“El hombre nace libre, responsable y sin excusas”

(Jean Paul Sastre)

“Puedo vivir con la duda, la incertidumbre y el no saber. Pienso que es mucho más interesante vivir sin saber que tener respuestas que podrían ser erróneas. Tengo respuestas aproximadas, creencias posibles y diferentes grados de certidumbre acerca de diferentes cosas, pero no estoy completamente seguro de nada y hay muchas cosas de las que no sé nada. No necesito conocer la respuesta. No siento miedo de no saber cosas, de estar perdido en un universo misterioso sin propósito alguno, que es la forma como veo las cosas hasta el momento. No me asusta.”

(Richard P. Feynman)

AGRADECIMIENTOS



No sé si alguien puede llegar a imaginarse la importancia sentimental y la profunda liberación que tiene acabar y presentar, por fin, esta Tesis Doctoral. Pero no sólo para mí, sino también para los míos, sobre todo para quienes me han alentado tanto a lo largo de este largo viaje, animándome sin pausa en esta etapa de mi vida. Y es que han pasado unos cuantos años desde que llegue al Instituto del Frío.... Durante todo este tiempo, han sido muchas las personas que han ayudado de una manera u otra en la elaboración de este trabajo. Así que espero ser capaz de nombrarlos a todos y, sobre todo, transmitir mi más sincero y profundo agradecimiento.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directoras de tesis, María y Carmen, el haberme brindado la oportunidad de realizar esta Tesis y de conocer el mundo de la Ciencia. A María, me gustaría darle las gracias de un modo especial por su constante entrega y dedicación. Sin tu ayuda y constantes ánimos no hubiera podido acabar este trabajo. Gracias también por la paciencia mostrada en nuestras interminables ‘discusiones’ científicas, los conocimientos aportados y por no rendirte nunca, rescatándome telefónicamente cuando, entre *capuccino* y *capuccino*, todo se tornaba de un color muy negro. Y a ti Carmen, gracias por haber confiado en mí y por la ayuda y consejos proporcionados durante la elaboración de esta Tesis. Aunque hayamos tenido múltiples discusiones (y las que tendremos....), te agradezco especialmente que hayas considerado siempre mi opinión y el haberme buscado y proporcionado las becas y contratos que han permitido llevar este proyecto a término.

A Maite me gustaría agradecerle muchísimas cosas, pero ni siquiera sé por donde empezar. Gracias por tu apoyo permanente, la comprensión de mis locuras, los ánimos constantes, la múltiple ayuda y conocimientos científicos aportados, tu silencio cómplice ante mis confidencias y confesiones, por ayudarme a superar momentos difíciles.... En suma, gracias por tu gran amistad. Ha sido un gran placer compartir profesionalmente estos años contigo y espero que en un futuro volvamos a pasar buenos momentos en un laboratorio (fuera ya sé que sí....).

Muchas gracias a Irene por tu compañía, sonrisas, apoyo, ánimos y cientos de charlas terapéuticas durante todo el tiempo que estuvimos juntos en el laboratorio. Por enseñarme a ‘comportarme’ en sociedad y a mirar las cosas de frente. Por intentar, en vano, que supere mi contradicción baile-movimiento (hay cosas que son imposibles....). Y muchas gracias por tu especial amistad a lo largo de todos estos años. Aunque exista una distancia física entre nosotros, hay momentos y sentimientos que se quedan más grabados que los tatuajes que me jalonan.

Gracias también a toda la gente con la que ha compartido mi paso por el laboratorio o el Instituto. De mis primeros años, me gustaría agradecer a Roberto su ayuda en la adaptación al laboratorio, su sentido del humor y las largas conversaciones ante una cerveza en Vallecas. A Sonia, gracias por las cientos de cafés matutinos, las charlas, las fiestas, las risas que nos hemos echado, tu forma de ser tan ‘auténtica’ y por haberte acordado de mí y ofrecerme la posibilidad de asistir al curso de antioxidantes en Kiel (no sabes lo importante que fue y el subidón de ánimo que me dio). Y aunque sólo hemos coincidido durante el último año, me gustaría agradecer a María B el magnífico recibimiento con me proporcionaste en mi vuelta al ‘hogar’. Gracias especialmente por tu carácter risueño y optimista, tu sonrisa permanente y por la portada (te debo

una, te la pagaré en mojitos....). También quería expresar mi agradecimiento a Óscar por su inestimable ayuda con las decenas de *Westerns* que tuve que realizar y su comprensión con mi peculiar forma de trabajar. Gracias así mismo a Clara por su paciencia a la hora de explicarme como poner a punto un ensayo antifúngico. Y a Sara por alegrarme más de un día regular con su buen humor perenne.

A Pilar Estrada, mi tutora durante la tesis, por estar siempre dispuesta a ayudarme y aconsejarme aunque desapareciese durante años. Al departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la UCM. Al personal del Instituto del Frío, especialmente al personal laboral y administrativo por tolerar mi personalidad anárquica durante todos los papeleos. A la Unidad de Proteómica de la UCM/PCM, especialmente a Lola, por los conocimientos aportados y por su paciencia a la hora de analizar unas muestras tan 'raras'. A todo el grupo de Microscopía Electrónica del CCMA por las magníficas imágenes obtenidas y por encontrar siempre un hueco para nuestros experimentos. Al Dr. Fritig por su generosidad a la hora de proporcionar repetidas veces al grupo anticuerpos frente a PR-2 y PR-Q. Al Ministerio de Ciencia y Tecnología por haberme concedido una beca FPU.

Quiero agradecer profundamente al grupo de entrañables enfermos mentales (y quizás amigos, pero no os emocionéis todavía) que me acogió con los brazos abiertos en mi exilio en el Instituto Cajal. Gracias Gubito, YanClod, Rulo, Txirri (*afterpunkespunkparapijos*) y Bort por los buenos momentos, enseñarme a hacer un *Western* en condiciones, la enooooorme paciencia con mis continuas chapuzas iniciales (y finales), risas, fiestas en el Dark Hole, el descubrimiento del lado turbio de la vida, la despedida por Chueca.... Y por recordarme que no es contradictorio que te guste la Ciencia, escuchar RATM rodeado de cientos de borrachos y beber cervezas calientes. También muchísimas gracias a los 'adosados' al C-17, Ana, Loren, Anahi (que te vaya muy bien en México-Boston-Suiza), por los ánimos, consejos y largas conversaciones en las que me desahogaba de todo y todos.

A los *bears*, *cubes*, *wolfies* y *chasers* de Madrid (los fans lo entenderán). No sé si la Tesis se ha acelerado o frenado por vosotros, pero hubiera sido diferente sin vuestra presencia. Así que una parte también os pertenece....

Y por supuesto, millones de gracias a todos mis amigos. Un gran trozo de esta Tesis también es de vosotros. Os agradezco muchísimo vuestra ayuda en los momentos difíciles y el haber compartido tantos buenos momentos a lo largo de todos estos años. Al grupo primigenio de Pamplona (Raquel, Gorka, Mónica, Oihana, Ricardo, Iñigo): no hay palabras para expresar cuanto valoro vuestra amistad incondicional, vuestro aguante a mis idas de olla, vuestra comprensión a mis meses de ausencias y silencios. A David por su profunda amistad, escuchar confidencias, aguantar mis extensas chapas cuando íbamos de fiesta en fiesta por Madrid (¿volveremos algún día a Space?). A las incorporaciones iruindarras, madrileñas y lisboetas posteriores (Aritz, Willy, Eneko, Capi, Marcos, Javi, Pedro, Maider, Idoia, Fernando, Ana, Carlos, Arrate, Hernani,...), gracias por las risas, las cenas y los magníficos ratos que hemos compartido. A Marcos, mi querido compañero de piso uruguayo empeñado en psicoanalizarme y buscar una

razón a mi tara mental (creo que quedo claro en el concierto de Manson). Quiero agradecer también a Cristina (y a Alberto por extensión) su enorme amistad, su cariño cuando estaba hundido, su risa contagiosa (¡no cambies nunca!), sus ánimos y las largas conversaciones filosóficas en el balcón de casa (*qui suit le succès, ma petite suisse...*).

Por último, quisiera sobre todo expresar mi más profundo agradecimiento a mi familia. No hay palabras para expresar la enorme gratitud y emoción que tengo por el apoyo y amor incondicional de mis padres. Gracias por enseñarme todos los valores de la vida, qué querer es poder, por inculcarme la importancia de la honradez y el trabajo, por aceptarme y quererme tal como soy, por su comprensión, confianza, ánimos y paciencia ante los continuos aplazamientos (mamá, papá, por fin, la voy a leer. Esta vez es verdad, jeje), por el apoyo económico y múltiples sacrificios que han tomado para que intentase desarrollar una carrera científica. Muchas gracias también a mi hermano Alberto por su especial cariño y apoyo, por ser mi mejor confidente, por tantas noches de fiesta y conversaciones transcendentales, por estar en los buenos y malos momentos. A mi ‘cuñada’ Uxue (por fin estrenarás el modelito, jeje) por juzgarme con cariño, por aguantar mis parrafadas sobre cualquier cosa, por creer que algún día acabaría, por las carcajadas que me arrancaba (y arranca), por bailar en Olite el mejor aurreku del mundo. Al final de este camino tengo el apoyo de un hombre estupendo que ha decidido compartir su vida conmigo y empezar una etapa nueva. Estos últimos meses tu apoyo ha sido fundamental para cerrar este capítulo de mi vida. Javier, eres una de las razones para seguir luchando y ojala pueda corresponderte con todo lo que tengo. Tu amor ha sido siempre incondicional y sé que estás dispuesto a ir y volver tan lejos como sea necesario con tal de seguir juntos (aunque prefieras Berlín para mi postdoc...). Gracias por tu paciencia durante mis largas ausencias, por escucharme y animarme, por hacerme reír cuando estaba abatido, por ser el mejor compañero que podría imaginar.

ÍNDICE GENERAL



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XVII
ABREVIATURAS	XIX
INTRODUCCIÓN	1
1.- Mecanismos de defensa en plantas frente a patógenos	3
1.1.- El concepto de inmunidad natural en plantas	3
1.2.- Proteínas relacionadas con la patogénesis (PR)	5
1.2.1.- Definición y clasificación de proteínas PR	6
1.2.2.- Características bioquímica y funcionalidad de las proteínas PR	6
1.2.3.- Regulación de los genes de las proteínas PR	7
1.3.- Quitinasas (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11)	8
1.3.1.- Clasificación de quitinasas	10
1.3.1.1.- Estructura primaria	10
1.3.1.2.- Glucosil hidrolasas	13
1.3.1.3.- Mecanismo de hidrólisis	15
1.3.2.- Estructura y regulación de los genes de las quitinasas	17
1.3.3.- Funcionalidad de las quitinasas	18
1.4.- 1,3-β-Glucanasas (PR-2)	21
1.4.1.- Clasificación de 1,3-β-glucanasas	22
1.4.1.1.- Estructura primaria	22
1.4.1.2.- Mecanismo de hidrólisis	23
1.4.2.- Estructura y regulación de los genes de las 1,3-β-glucanasas	23
1.4.3.- Funcionalidad de las 1,3-β-glucanasas	24
2.- Respuestas y mecanismos de defensa de las plantas ante el estrés por frío	26

2.1.- Percepción y transducción de la señal de frío	27
2.2.- Regulación de la expresión génica durante el estrés por frío	28
2.3.- Respuestas estructurales y bioquímicas asociados al estrés por frío	29
2.4.- El daño por frío	33
2.4.1.- Definición y características del daño por frío	33
2.4.2.- Cambios fisiológicos y bioquímicos del daño por frío	37
2.5.- Papel protector de las proteínas PR durante el estrés por frío	41
2.6.- Tolerancia inducida a las bajas temperaturas en frutos y hortalizas por la aplicación de tratamientos post-recolección	42
2.6.1.- Definición y características de los tratamientos post-recolección	42
2.6.1.1.- <i>Atmósferas controladas, modificadas y pretratamientos con CO₂</i>	43
2.6.1.2.- <i>Tratamientos térmicos</i>	44
2.6.1.3.- <i>Tratamientos químicos</i>	45
2.6.2.- Cambios fisiológicos y bioquímicos asociados a la tolerancia inducida a las bajas temperaturas	45
OBJETIVOS	51
MATERIALES Y MÉTODOS	55
1.- Material vegetal	57
1.1.- Recolección y selección de frutos	57
1.2.- Condiciones de conservación posrecolección de los frutos	57
1.2.- Preparación y toma de muestras	57
2.- Análisis fisicoquímicos	58
2.1.- Sólidos solubles totales	58
2.2.- Aislamiento y cuantificación de la materia seca	58
3.- Extracción y cuantificación de almidón	58
3.1.- Aislamiento de almidón	58
3.2.- Determinación de almidón por calorimetría diferencial de barrido (DSC)	59
4.- Evaluación de la ultraestructura mediante LT-SEM	59
5.- Extracción y determinación de solutos osmoprotectores	60

5.1.- Aminoácidos libres	60
5.2.- Azúcares solubles	60
5.3.- Glicina betaína	61
5.4.- Poliaminas libres	62
5.4.1.- Extracción y derivatización de las poliaminas libres	62
5.4.2.- Identificación y cuantificación de las poliaminas libres	62
6.- Determinación del patrón de isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa	63
6.1.- Extracción y precipitación de las proteínas	63
6.1.1.- Homogenización y eliminación de hidrocoloides	63
6.1.2.- Precipitación con sulfato amónico	63
6.1.3.- Cromatografía de intercambio aniónico	64
7.- Purificación de isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa	64
7.1.- Purificación de isoenzimas ácidas	65
7.1.1.- Cromatografía de afinidad en columna de quitina y cromatografía de intercambio aniónico	65
7.1.1.1.- Preparación de la columna de quitina	65
7.1.1.2.- Fraccionamiento cromatográfico	65
7.1.2.- Cromatografía de intercambio iónico por punto isoelectrico	66
7.1.2.1.- Aislamiento de proteínas en gradiente de pH 6-4	66
7.1.2.2.- Aislamiento de proteínas en gradiente de pH 6-4	66
7.1.2.3.- Aislamiento de proteínas en gradiente de pH 6-5	66
7.2.- Purificación de isoenzimas básica	67
7.2.2.- Cromatografía de intercambio iónico por punto isoelectrico	66
7.2.2.1.- Aislamiento de proteínas en gradiente de pH 9-7	67
7.2.2.2.- Aislamiento de proteínas en gradiente de pH 9-8	68
8.- Determinación de la concentración de proteína	68
8.1.- Absorbancia a 280 nm	68
8.2.- Método de Bradford	68
8.3.- Método del BCA	69

9.- Técnicas electroforéticas e inmunológicas	69
9.1.- Electroforesis SDS-PAGE	69
9.1.1.- Soluciones y tampones	69
9.1.2.- Geles	69
9.1.3.- Preparación de las muestras y condiciones de electroforesis	70
9.1.4.- Tinción de geles	70
9.1.4.1.- Tinción con azul de Coomassie	70
9.1.4.2.- Tinción con sales de plata	70
9.2.- Inmunodetección en membrana de PVDF (<i>Western blotting</i>)	71
9.2.1.- Soluciones y tampones	71
9.2.2.- Transferencia por método húmedo	71
9.2.3.- Inmunodetección mediante anticuerpos conjugados a enzima peroxidasa	71
9.3.- Detección de glicoproteínas	72
10.- Ensayos de actividad enzimática	72
10.1.- Ensayo de actividad quitinasa	72
10.2.- Ensayo de actividad 1,3- β -glucanasa	73
11.- Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de las isoenzimas purificadas	74
11.1.- pH óptimo	74
11.2.- Estabilidad a pH	74
11.3.- Temperatura óptima	74
11.4.- Estabilidad a la temperatura	75
11.5.- Determinación de los parámetros termodinámicos de la reacción enzimática	75
12.- Determinación de parámetros fisicoquímicos de las isoenzimas purificadas	77
12.1.- Determinación de la masa molecular	77
12.1.1.- Electroforesis SDS-PAGE	77
12.1.2.- Espectrometría de masas (MALDI-TOF)	77
12.2.- Determinación del punto isoelectrico	77
13.- Mecanismo de hidrólisis de las isoenzimas purificadas	78
12.1.- Isoenzimas quitinasa	78

12.2.- Isoenzimas 1,3- β -glucanasa	78
14.- Caracterización cinética de las isoenzimas purificadas	80
15.- Identificación de las isoenzimas purificadas mediante técnicas proteómicas	81
15.1.- Electroforesis en condiciones desnaturalizantes	81
15.2.- Recuperación y digestión de las proteínas de los geles de poliacrilamida	81
15.3.- Identificación de proteínas mediante huella peptídica	83
15.4.- Identificación de proteínas mediante secuenciación de péptidos	83
15.5.- Búsqueda en bases de datos	83
16.- Estudio de la funcionalidad de las isoenzimas purificadas	84
16.1.- Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad antifúngica	84
16.1.1.- Condiciones y almacenamiento del cultivo	84
16.1.2.- Ensayo <i>in vitro</i> de actividad antifúngica frente a <i>Botrytis cinerea</i>	85
16.2.- Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad crioprotectora de las isoenzimas purificadas	85
16.3.- Determinación de la actividad anticongelante de las isoenzimas purificadas	86
17.- Elaboración análisis filogenético	87
18.- Análisis estadístico	87
19.- Herramientas bioinformáticas utilizadas	87
RESULTADOS	91
1.- Determinación ultraestructural del daño por frío mediante LT-SEM y efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂	93
2.- Papel de los solutos compatibles en la conservación a bajas temperaturas y efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂	97
2.1.- Aminoácidos libres	97
2.2.- Azúcares solubles y almidón	99
2.3.- Glicina betaína	101
2.4.- Poliaminas libres	103
3.- Distribución de la actividad enzimática y del patrón de isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa durante la maduración y la conservación a bajas temperaturas. Efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂	105
3.1.- Evolución de las actividades quitinasa y 1,3- β -glucanasa	105

3.1.1.- Actividad enzimática quitinasa	105
3.1.2.- Actividad enzimática 1,3- β -glucanasa	108
3.2.- Patrón de isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa	111
3.1.1.- Análisis de isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa ácidas	111
3.1.2.- Análisis de isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa básicas	116
4.- Purificación de isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa en chirimoya	121
4.1.- Extracción y precipitación de proteínas	121
4.2.- Aislamiento de isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa mediante cromatografía líquida	123
4.2.1.- AChi24 y AChi48	124
4.2.2.- AChi26	125
4.2.3.- BChi33	129
4.2.4.- BChi14	131
4.2.5.- AGlu19	132
5.- Identificación de las isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa mediante técnicas proteómicas	135
6.- Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de las isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa	145
6.1.- pH óptimo y estabilidad al pH	145
6.2.- Temperatura óptima y termoestabilidad	147
7.- Propiedades fisicoquímicas de las isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa	150
7.1.- Determinación de la masa molecular	150
7.2.- Determinación del punto isoeléctrico	152
7.3.- Determinación de la presencia de glicosilaciones	154
8.- Estudio cinético de las isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa	154
8.1.- Cálculo de los parámetros cinéticos	154
8.1.1.- AChi24 y AChi26	155
8.1.2.- BChi33 y AChi48	158
8.1.3.- BChi14	166
8.1.4.- AGlu19	168
8.2.- Determinación del mecanismo de hidrólisis	171

8.2.1.- Isoenzimas quitinasa	171
8.2.2.- Isoenzima 1,3- β -glucanasa	173
8.3.- Estudio del efecto sinérgico entre isoenzimas quitinasa	174
8.4.- Determinación de los parámetros termodinámicos de la reacción enzimática	177
9.- Estudio de la funcionalidad de las isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa	182
9.1.- Actividad antifúngica <i>in vitro</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i>	182
9.1.1.- Fracciones proteicas ácidas y básicas	182
9.1.2.- Isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas	187
9.1.3.- Efectos sinérgicos entre isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa	187
9.2.- Actividad crioprotectora <i>in vitro</i> frente a lactato deshidrogenasa (LDH)	192
9.2.1.- Fracciones proteicas ácidas y básicas	192
9.2.2.- Isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas	194
9.3.- Evaluación de la actividad de histéresis termal mediante DSC	197
DISCUSIÓN	201
1.- Estudio del patrón isoenzimático de quitinasas y 1,3- β -glucanasas en chirimoya y su relación con la actividad hidrolítica y antifúngica <i>in vitro</i>	203
2.- Evaluación de una respuesta inicial de proteínas PR frente a un estrés por conservación a bajas temperaturas: inducción de AChi24 y AChi26	211
3.- Caracterización de una isoenzima quitinasa ácida adaptada al frío como parte de una respuesta inicial de proteínas PR frente a un estrés por conservación a bajas temperaturas: inducción de AChi48	225
4.- Cambios ultraestructurales y bioquímicos asociados a la conservación prolongada a bajas temperaturas. Correlación existente entre la inducción de BChi33 y el daño celular	239
5.- Mecanismos bioquímicos asociados al incremento de la tolerancia a las bajas temperaturas por la aplicación de un pretratamiento con altas concentraciones de CO ₂	248
CONCLUSIONES	261
BIBLIOGRAFÍA	265

ANEXOS	319
ANEXO I	321
ANEXO II	328
ANEXO III	361
ANEXO IV	362

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diferentes clases de resistencia frente a patógenos en plantas.	5
Figura 2: Representación esquemática de las diferencias estructurales entre las clases de quitinasas en las plantas angiospermas.	13
Figura 3: Mecanismo catalítico de las quitinasas de las familias 18 y 19.	15
Figura 4: Mecanismos de hidrólisis de las enzimas quitinolíticas.	17
Figura 5: Modelo esquemático de las funciones de quitinasas y 1,3- β -glucanasas en la defensa de la planta contra el ataque de fitopatógenos	20
Figura 6: Diagrama de la red de regulación transcripcional sensible al frío en <i>A. thaliana</i>	30
Figura 7: Modelo esquemático de la relación existente entre respuestas primarias y secundarias del daño por frío	36
Figura 8: Síntomas visibles del daño por frío en frutos y hortalizas sensibles a las bajas temperaturas.	37
Figura 9: Esquema general del procedimiento de purificación de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa expresadas de forma diferencial en el mesocarpio de chirimoya.	67
Figura 10: Esquema general del procedimiento de identificación de proteínas por espectrometría de masas tipo MALDI.	82
Figura 11: Ultraestructura del mesocarpio de chirimoya durante la conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO ₂ .	95
Figura 12: Cambios en el contenido de aminoácidos libres en el mesocarpio de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO ₂ .	97
Figura 13: Distribución de los aminoácidos libres en el mesocarpio de frutos de chirimoya recién recolectados.	98
Figura 14: Cambios en el contenido de prolina en el mesocarpio de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO ₂ .	99
Figura 15: Cambios en el contenido de azúcares solubles en el mesocarpio de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO ₂ .	100
Figura 16: Cambios en el contenido de almidón y de sólidos solubles totales en el mesocarpio de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO ₂ .	101
Figura 17: Cambios en el contenido de glicina betaína en el mesocarpio de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO ₂ .	102

- Figura 18: Cambios en el contenido de poliaminas en el mesocarpo de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. 104
- Figura 19: Evolución de la actividad quitinasa de las diferentes fracciones proteicas obtenidas a lo largo de la purificación de extractos de mesocarpo de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂ 106
- Figura 20: Evolución de la actividad 1,3-β-glucanasa de las diferentes fracciones proteicas obtenidas a lo largo de la purificación de extractos de mesocarpo de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂ 110
- Figura 21: Detección mediante inmunoensayo de isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa ácidas obtenidas de extractos del mesocarpo de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. 112
- Figura 22: Intensidades de las bandas de las isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa ácidas constitutivas de extractos del mesocarpo de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. 113
- Figura 23: Detección mediante inmunoensayo de isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa ácidas y básicas obtenidas de extractos del mesocarpo de chirimoya durante la maduración a 20 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. 114
- Figura 24: Intensidades de las bandas de isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa ácidas constitutivas de extractos del mesocarpo de chirimoya durante la maduración a 20 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. 115
- Figura 25: Detección mediante inmunoensayo de isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa básicas obtenidas de extractos del mesocarpo de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. 117
- Figura 26: Intensidades de las bandas de isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa básicas constitutivas de extractos del mesocarpo de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. 118
- Figura 27: Intensidades de las bandas de isoenzimas quitinasa básicas constitutivas de extractos del mesocarpo de chirimoya durante la maduración a 20 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. 119
- Figura 28: Intensidades de las bandas de isoenzimas 1,3-β-glucanasa básicas constitutivas de extractos del mesocarpo de chirimoya durante la maduración a 20 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. 120
- Figura 30: Perfil de elución mediante cromatografía de intercambio aniónico de la retención de proteínas y de la actividad quitinasa de un extracto del mesocarpo de chirimoyas pretratadas con altas concentraciones de CO₂ y conservadas 9 días a 6 °C. 124
- Figura 31: Perfil de elución mediante cromatografía de intercambio aniónico de la retención de proteínas y de la actividad quitinasa de la fracción eluida de la columna de quitina. 125
- Figura 32: Perfil de elución mediante cromatografía de intercambio aniónico de la retención de proteínas y de la actividad quitinasa de un extracto del mesocarpo de chirimoyas conservadas 5 días a 6 °C. 127

Figura 33: Perfil de elución mediante cromatoenfoque (pH 6-4) de la retención de proteínas y de la actividad quitinasa de la fracción ácida del mesocarpo de chirimoyas conservadas 5 días a 6 °C.	127
Figura 34: Perfil de elución mediante cromatoenfoque (pH 5-4) de la retención de proteínas y de la actividad quitinasa de las fracciones 29-32 eluidas en un gradiente de pH 6-4.	128
Figura 35: Perfil de elución mediante cromatoenfoque (pH 9-7) de la retención de proteínas y de la actividad quitinasa de la fracción básica del mesocarpo de chirimoyas conservadas 9 días a 6 °C.	129
Figura 36: Perfil de elución mediante cromatoenfoque (pH 9-8) de la retención de proteínas y de la actividad quitinasa de las fracciones 8-10 eluidas en un gradiente de pH 9-7.	130
Figura 37: Perfil de elución mediante cromatoenfoque (pH 9-7) de la retención de proteínas y de la actividad quitinasa de la fracción básica del mesocarpo de chirimoyas pretratadas con altas concentraciones de CO ₂ y conservadas 9 días a 6 °C.	131
Figura 38: Perfil de elución mediante cromatografía de intercambio aniónico de la retención de proteínas y de la actividad 1,3-β-glucanasa de un extracto del mesocarpo de chirimoyas pretratadas con altas concentraciones de CO ₂ y conservadas 9 días a 6 °C.	133
Figura 39: Perfil de elución mediante cromatoenfoque (pH 6-4) de la retención de proteínas y de la actividad 1,3-β-glucanasa de las fracciones 10-11 de la fracción ácida del mesocarpo de chirimoyas pretratadas con altas concentraciones de CO ₂ y conservadas 9 días a 6 °C.	133
Figura 40: Perfil de elución mediante cromatoenfoque (pH 6-5) de la retención de proteínas y de la actividad 1,3-β-glucanasa de las fracciones 15-18 eluidas en un gradiente de pH 6-4.	134
Figura 41: Alineamiento de las secuencia de aminoácidos de los siete péptidos generados a partir de BChi33 con la secuencias de quitinasas de plantas de clase Ib y Ia, incluyendo la quitinasa de <i>C. sativa</i> identificada por MASCOT.	142
Figura 42: Alineamiento de las secuencia de aminoácidos de uno de los péptidos generados a partir de AChi48 con la secuencias de quitinasas de plantas de clase Ia y Ib, incluyendo la secuencia parcial de la quitinasa de clase I de <i>C. annuum</i> identificada por FASTS.	143
Figura 43: Alineamiento de las secuencia de aminoácidos de tres de los péptidos generados a partir de AChi24 con la secuencias de quitinasas de plantas de clase IV, incluyendo la quitinasa de <i>V. pseudoreticulata</i> identificada por FASTS.	144
Figura 44: Efecto del pH sobre la actividad enzimática y estabilidad de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpo de chirimoya AChi48, AChi26 y AChi24.	146
Figura 45: Efecto del pH sobre la actividad enzimática y estabilidad de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpo de chirimoya BChi33 y BChi14.	146
Figura 46: Efecto del pH sobre la actividad enzimática y estabilidad de la isoenzima AGlu19 purificada de mesocarpo de chirimoya.	147
Figura 47: Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática y estabilidad de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpo de chirimoya AChi48, AChi26 y AChi24.	148
Figura 48: Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática y estabilidad de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpo de chirimoya BChi33 y BChi14.	149

Figura 49: Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática y estabilidad de la isoenzima AGlu19 purificada de mesocarpio de chirimoya.	149
Figura 50: Análisis electroforético de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas de mesocarpio de chirimoya.	151
Figura 51: Caracterización del doblete de isoenzimas asignado a AChi40 en la primera etapa de cromatofoco de la purificación de AChi26.	152
Figura 52: Detección de carbohidratos asociados a las isoenzimas AGlu19 y AChi26.	154
Figura 53: Análisis cinético frente a CM-Chitin-RBV de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya AChi24 y AChi26.	156
Figura 54: Análisis cinético frente a 4-MU- β -(GlcNAc) ₂ de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya AChi24 y AChi26.	156
Figura 55: Análisis cinético frente a 4-MU- β -(GlcNAc) ₃ de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya AChi24 y AChi26.	157
Figura 56: Análisis cinético frente a 4-MU- β -GlcNAc de las isoenzima quitinasa purificada de mesocarpio de chirimoya AChi26.	157
Figura 57: Análisis cinético frente a CM-Chitin-RBV de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya BChi33 y AChi48.	159
Figura 58: Análisis cinético frente a 4-MU- β -(GlcNAc) ₂ de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya BChi33 y AChi48.	160
Figura 59: Análisis cinético frente a 4-MU- β -(GlcNAc) ₃ de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya BChi33 y AChi48.	160
Figura 60: Representación de Hill frente a CM-Chitin-RBV de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya BChi33 y AChi48.	162
Figura 61: Representación de Hill frente a 4-MU- β -(GlcNAc) ₂ de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya BChi33 y AChi48.	162
Figura 62: Representación de Hill frente a 4-MU- β -(GlcNAc) ₃ de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya BChi33 y AChi48.	163
Figura 63: Representación recíproca de la velocidad específica frente a CM-Chitin-RBV de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya BChi33 y AChi48	165
Figura 64: Representación recíproca de la velocidad específica frente a 4-MU- β -(GlcNAc) ₂ de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya BChi33 y AChi48.	165
Figura 65: Representación recíproca de la velocidad específica frente a 4-MU- β -(GlcNAc) ₃ de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya BChi33 y AChi48.	166
Figura 66: Análisis cinético frente a CM-Chitin-RBV de la isoenzima quitinasa purificada de mesocarpio de chirimoya BChi14.	167
Figura 67: Análisis cinético frente a 4-MU- β -(GlcNAc) ₂ de la isoenzima quitinasa purificada de mesocarpio de chirimoya BChi14.	167

Figura 68: Análisis cinético frente a 4-MU- β -(GlcNAc) ₃ de la isoenzima quitinasa purificada de mesocarpio de chirimoya BChi14.	168
Figura 69: Análisis cinético frente a laminarina de la isoenzima AGlu19 purificada de mesocarpio de chirimoya.	170
Figura 70: Efectos sinérgicos entre AChi26 y AChi48 en la hidrólisis de CM-Chitin-RBV.	175
Figura 71: Efectos sinérgicos entre AChi26 y AChi24 en la hidrólisis de CM-Chitin-RBV.	176
Figura 72: Representación de Arrhenius de las isoenzimas quitinasa purificadas del mesocarpio de chirimoya AChi48, AChi26 y AChi24.	177
Figura 73: Representación de Arrhenius de las isoenzimas quitinasa purificadas del mesocarpio de chirimoya BChi33 y BChi14.	178
Figura 74: Representación de Arrhenius de la isoenzima AGlu19 purificada del mesocarpio de chirimoya AGlu19.	178
Figura 75: Ensayo de inhibición del crecimiento del micelio de <i>Botrytis cinerea</i> por parte de fracciones proteicas ácidas y básicas procedentes del mesocarpio de chirimoya tratada y no tratada con altas concentraciones de CO ₂ durante su conservación a 6 °C.	185
Figura 76: Ensayo de inhibición del crecimiento del micelio de <i>Botrytis cinerea</i> por parte de fracciones proteicas ácidas y básicas procedentes del mesocarpio de chirimoya tratada y no tratada con altas concentraciones de CO ₂ durante su maduración a 20 °C.	186
Figura 77: Ensayo de inhibición del crecimiento del micelio de <i>Botrytis cinerea</i> por parte de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas del mesocarpio de chirimoya.	188
Figura 78: Ensayo de inhibición del crecimiento del micelio de <i>Botrytis cinerea</i> por parte de mezclas entre isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas del mesocarpio de chirimoya.	190
Figura 79: Actividad crioprotectora <i>in vitro</i> frente a LDH de las fracciones proteicas ácidas y básicas extraídas del mesocarpio de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO ₂ .	193
Figura 80: Correlación entre la intensidad de la banda de la isoenzima AGlu19 y la actividad crioprotectora <i>in vitro</i> frente a LDH de la fracción proteica ácida extraída del mesocarpio de chirimoya pretratada con altas concentraciones de CO ₂ durante su conservación a 6 °C.	194
Figura 81: Actividad crioprotectora <i>in vitro</i> frente a LDH por parte de las isoenzimas quitinasa AChi48, AChi26, AChi24 y BChi33 purificadas del mesocarpio de chirimoya.	195
Figura 82: Actividad crioprotectora <i>in vitro</i> frente a LDH por parte de las isoenzimas BChi14 y AGlu19 purificadas del mesocarpio de chirimoya.	195
Figura 83: Termogramas de recristalización de BSA y AFP de tipo III purificada del pez <i>M. americanus</i> .	198
Figura 84: Termogramas de recristalización de las isoenzimas quitinasa purificadas del mesocarpio de chirimoya AChi24, AChi26 y AChi48.	199
Figura 85: Termogramas de recristalización de las isoenzimas purificadas del mesocarpio de chirimoya AGlu19, BChi14 y BChi33.	199

Figura 86: Termogramas de recristalización de BSA, AFP de tipo III purificada del pez *M. americanus* y de la isoenzima AChi48 purificada del mesocarpio de chirimoya en presencia de tampón citrato sódico 100 mM. 200

Figura 87: Esquema de los modelos de cooperatividad cinética para enzimas monoméricas frente a un sustrato. 234

Figura 88: Esquema de fragmentación de péptidos mediante EM/EM. 328

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Familias de PRs y su funcionalidad.	9
Tabla 2: Nomenclatura de las quitinasas de plantas.	11
Tabla 3: Composición de geles de acrilamida para un volumen total de 10 mL.	70
Tabla 4: Oligosacáridos de NAG asociados a 4-MU utilizados como sustratos en la detección de enzimas quitinolítica	79
Tabla 5: Secuencias utilizadas para la elaboración del árbol filogenético del gen <i>18S</i> ARNr de chirimoya.	90
Tabla 6: Evolución de la actividad quitinasa y 1,3- β -glucanasa de las diferentes fracciones proteicas obtenidas a lo largo de la purificación de extractos de mesocarpio de chirimoya durante su maduración a 20 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO ₂ .	108
Tabla 7: Purificación de AChi48 y AChi24 a partir de mesocarpio de chirimoyas pretratadas con altas concentraciones de CO ₂ y conservadas 9 días a 6 °C.	126
Tabla 8: Purificación de AChi26 a partir de mesocarpio de chirimoyas conservadas 5 días a 6 °C.	128
Tabla 9: Purificación de BChi33 a partir de mesocarpio de chirimoyas conservadas 9 días a 6 °C.	130
Tabla 10: Purificación de BChi14 a partir de mesocarpio de chirimoyas pretratadas con altas concentraciones de CO ₂ y conservadas 9 días a 6 °C.	132
Tabla 11: Purificación de AGlu19 a partir de mesocarpio de chirimoyas pretratadas con altas concentraciones de CO ₂ y conservadas 9 días a 6 °C.	134
Tabla 12: Identificación de las isoenzimas AChi26, BChi33, BChi14 y AGlu19 purificadas del mesocarpio de chirimoya mediante espectrometría de masas.	138
Tabla 13: Identificación de los péptidos de la isoenzima BChi33 purificada del mesocarpio de chirimoya mediante MALDI-TOF/TOF y búsqueda en las base de datos	139
Tabla 14: Identificación de las isoenzimas AChi48 y AChi24 purificadas del mesocarpio de chirimoya mediante la secuenciación de novo de aminoácidos.	140
Tabla 15: Propiedades fisicoquímicas de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa extraídas del mesocarpio de chirimoya tratada o no tratada con altas concentraciones de CO ₂ durante su conservación 6°C o madurando a 20 °C.	153
Tabla 16: Propiedades cinéticas de las isoenzimas quitinasa purificadas del mesocarpio de chirimoya.	169
Tabla 17: Parámetros de la ecuación de Hill y de la cooperatividad cinética para las isoenzimas BChi33 y AChi48 frente a diferentes sustratos.	170
Tabla 18: Propiedades cinéticas de las isoenzima AGlu19 purificada del mesocarpio de chirimoya.	171

Tabla 19: Ratios de las constantes catalíticas de las isoenzimas quitinasa purificadas del mesocarpo de chirimoya frente a los sustratos fluorogénicos 4-MU- β -(GlcNAc) ₂ y 4-MU- β -(GlcNAc) ₃	173
Tabla 20: Efecto de diferentes sustratos e inhibidores sobre la actividad enzimática de AGlu19.	174
Tabla 21: Variación del coeficiente de sinergismo de las isoenzimas quitinasa ácidas con el tiempo de reacción.	176
Tabla 22: Parámetros termodinámicos de activación de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas del mesocarpo de chirimoya.	179
Tabla 23: Variación de los parámetros termodinámicos de activación entre la isoenzima AChi48 y el resto de isoenzimas quitinasas purificadas del mesocarpo de chirimoya.	181
Tabla 24: Cuantificación de la inhibición del crecimiento del micelio de <i>Botrytis cinerea</i> por parte de fracciones proteicas ácidas y básicas procedentes del mesocarpo de chirimoya tratada y no tratada con altas concentraciones de CO ₂ durante su conservación 6 °C o madurando a 20 °C.	183
Tabla 25: Cuantificación de la inhibición del crecimiento del micelio de <i>Botrytis cinerea</i> por parte de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas del mesocarpo de chirimoya.	188
Tabla 26: Cuantificación de la inhibición del crecimiento del micelio de <i>Botrytis cinerea</i> por parte de mezcla entre isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas del mesocarpo de chirimoya.	191
Tabla 27: Actividad crioprotectora <i>in vitro</i> frente a LDH por parte de proteínas inducidas en plantas y frutos por efecto de las bajas temperaturas.	196

INTRODUCCIÓN

1.- Mecanismos de defensa en plantas frente a patógenos

Las plantas, como otros organismos multicelulares, están sometidas al ataque continuo de potenciales patógenos. Pero aunque su naturaleza sésil les imposibilita huir o escapar durante este proceso, es un hecho conocido que muchas de las plantas son resistentes a la mayoría de estos ataques, indicando que poseen todos los mecanismos moleculares necesarios para activar la defensa que inhiba este proceso. Así, el daño producido en la planta por agentes tales como virus, bacterias, hongos y nemátodos dependerá del balance entre dos fuerzas: la resistencia natural de la planta a ese determinado patógeno y la virulencia del mismo.

1.1.- El concepto de inmunidad natural en plantas

Una de las primeras líneas de defensa de las plantas es el establecimiento de una protección pasiva mediante la formación de un conjunto de barreras físicas capaces de impedir la entrada de los patógenos. Entre ellas se encuentran la cutícula, la pared celular o las aperturas naturales de las plantas (estomas, lenticelas, etc.). Sin embargo, los patógenos son capaces de superar algunas de estas barreras estructurales mediante la síntesis de diferentes enzimas hidrolíticas como la cutinasa o la peptinasa (Hückelhoven, 2007). Por ello, para contrarrestar este fenómeno, las plantas acumulan constitutivamente compuestos de baja masa molecular con propiedades antimicrobianas denominados fitoanticipinas. Entre los más conocidos nos encontramos con glucósidos cianogénicos, terpenoides como la saponina, ácido hidroxámico, compuestos fenólicos como los flavonoides o péptidos como las tioninas y defensinas (VanEtten *et al.*, 1994; Osbourn, 1999).

Sin embargo, una vez que los patógenos han sobrepasado este conjunto de defensas pasivas y han penetrado con éxito en los espacios intercelulares y sistemas vasculares de la planta, ésta pone en marcha un vasto y heterogéneo conjunto de respuestas de defensa inducibles. En este sentido, la anterior visión de la existencia de un sistema de defensa inespecífico en plantas y de un sistema inmune específico en animales ha sido corregida en los últimos 15 años. Actualmente, y hay excelentes revisiones en este sentido, se ha asumido la existencia de un sistema de inmunidad natural en plantas al igual que el descrito en animales e insectos (Jones y Dangl, 2006; Bittel y Robatzek, 2007; de Wit, 2007; Király *et al.*, 2007). Aunque la resistencia natural de las plantas y la inmunidad de los animales parecen funcionar bajo mecanismos análogos, obviamente existen importantes diferencias entre ambos sistemas. Así, por ejemplo, las plantas carecen de un sistema inmune adaptativo compuesto por un diverso repertorio de linfocitos B y T (Martín y Tschopp, 2005; Vivier y Malissen, 2005).

El sistema de inmunidad innato desarrollado por las plantas se encuentra dispuesto en dos niveles. De acuerdo al modelo *ZigZag* propuesto por Jones y Dangl (2006), la inmunidad innata primaria se alcanza a través de la interacción entre determinados receptores de reconocimiento de patógenos (*pathogen recognition receptors*, PRR) y una serie de patrones moleculares conservados asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP). Los

PAMP juegan un importante papel en la percepción del daño y en la activación de las respuestas de defensa, destacando entre ellos los fragmentos de quitina y glucanos procedentes de la pared celular de hongos, las glicoproteínas/péptidos fúngicos o los lipopolisacáridos bacterianos (Zipfel y Felix, 2005). Por otro lado, se han identificado y caracterizado un gran número de PRR, situándose en la superficie de las células (Altenbach y Robatzek, 2007). Independientemente de su naturaleza, la percepción de estos inductores derivados de patógenos inician una serie de eventos posteriores, incluyendo la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS; *reactive oxygen species*), óxido nítrico (NO) y etileno, la activación de cascadas MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), la fosforilación de sus objetivos subsiguientes y el establecimiento de respuestas de defensa como la modificación de la pared celular o la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis (Asai *et al.*, 2002; van Loon *et al.*, 2006).

Sin embargo, en la carrera armamentística desarrollada entre las plantas y los patógenos a lo largo de la evolución, hay que tener en cuenta que estos últimos pueden secretar una serie de proteínas denominadas ‘efectores’ que pueden inhibir el reconocimiento de los PAMP y la consiguiente inducción de respuestas de defensa (Göhre y Robatzek, 2008). Para defenderse de este tipo de patógenos, las plantas han desarrollado una segunda clase de inmunidad innata originada en el reconocimiento específico de alguno efectores, codificados por los genes de avirulencia *Avr*, por parte de receptores intracelulares, codificados a su vez por los genes de resistencia *R* (Jones y Dangl, 2006). Estos receptores consisten en proteínas polimórficas NB-LRR formadas por un número variable de repeticiones ricas en leucina y varios sitios de unión a nucleótidos (Takken *et al.*, 2006). En la base de este fenómeno se encuentra el mecanismo clásico de gen por gen, el cual especifica que un único gen dominante *R* del huésped sólo confiere resistencia frente a aquellos patógenos que contengan el correspondiente gen *Avr* (Flor, 1971). El reconocimiento, a veces indirecto, del efector del patógeno genera una respuesta más rápida y eficiente que la producida tras la interacción inicial PRR-PAMP, culminando en ciertas ocasiones en una respuesta hipersensitiva (HR, *hypersensitive response*; Fig. 1). En este sentido, la respuesta HR es el tipo de resistencia de plantas mejor estudiado y se encuentra caracterizado por el desarrollo de unas pequeñas lesiones necróticas en el tejido infectado mediante un proceso de muerte celular programada (PCD, *programmed cell death*) (Mur *et al.*, 2007). Este proceso se encuentra regulado por un red de señalización compuesta por moléculas que actúan como mensajeros secundarios como ácido salicílico (SA, *salicylic acid*), ROS o NO (Watanabe y Lam, 2006; y referencias asociadas). Asimismo, estos reguladores orquestan la expresión de diferentes grupos de genes de defensa que codifican proteínas antimicrobianas, como las proteínas PR, o enzimas que catalizan la producción de metabolitos de defensa (ROS, fitoalexinas, etc.).

Además de la defensa local, la resistencia de las plantas puede extenderse a regiones distantes de la respuesta inmune primaria y secundaria, permitiendo su protección de subsiguientes ataques de patógenos. Aunque este proceso es análogo a la memoria inmunológica de los vertebrados, los mecanismos son bastante diferentes. En este sentido, como puede verse en la Figura 1, la activación de una respuesta HR induce una respuesta de resistencia sistémica conocida como SAR (*systemic acquired resistance*). No obstante, aunque la inducción de la respuesta

SAR es originada normalmente tras la necrosis local provocada por los patógenos, esta causa no es exclusivamente necesaria para su desarrollo, pudiendo generarse por otras fuentes de estrés como daños mecánicos. Esta respuesta tiene una duración de semanas, no es específica, ya que actúa de forma efectiva frente a un amplio rango de patógenos, y es dependiente de la señalización individual o combinada de diferentes hormonas vegetales como SA, ácido jasmónico (JA, *jasmonic acid*), etileno y ácido absísico (ABA, *abscisic acid*). Por otro lado, el desarrollo de la respuesta SAR implica una serie de etapas características como la acumulación de SA en el citoplasma, la expresión sistemática de genes que codifican proteínas PR o el establecimiento de defensas adicionales como la liberación masiva de ROS u *oxidative burst*, alteraciones de la pared celular y la producción de fitoalexinas (Hammerschmidt, 2009; y referencias asociadas).

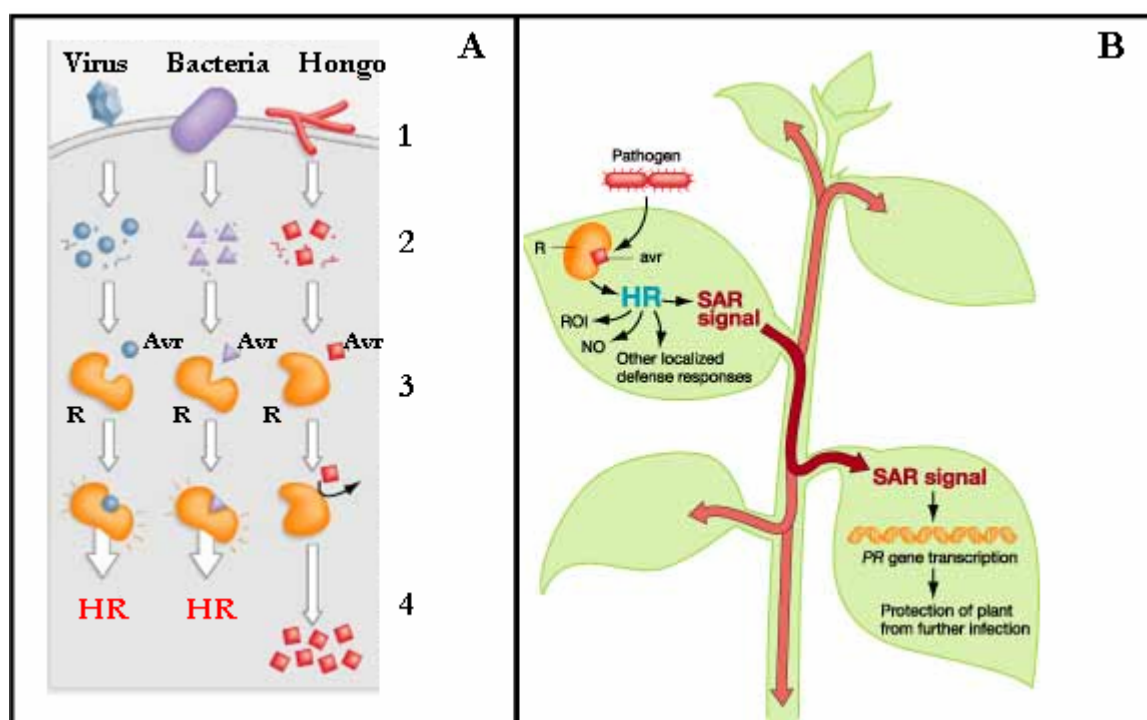


Figura 1. Diferentes clases de resistencia frente a patógenos en plantas (adaptado de Decoteau, 2004).
 (A) Diagrama de la respuesta HR: 1.- Los patógenos (virus, bacteria u hongo) entran en la célula de la planta. 2.- Los patógenos liberan proteínas y otras moléculas (efectores). 3.- Los productos de los genes R interaccionan con determinados efectores de los patógenos (proteínas Avr). 4.- La interacción Avr-R provoca el establecimiento de la respuesta HR. Cuando no se produce dicha interacción, no se induce la respuesta HR y la planta sucumbe a la infección. (B) Diagrama de la respuesta SAR originada tras la activación de una respuesta HR.

1.2.- Proteínas relacionadas con la patogénesis (PR)

Ya hemos apuntado que las respuestas de las plantas al ataque de microorganismos son complejas, implicando la expresión de numerosos conjuntos de genes que codifican proteínas con funcionalidades muy diversas. Entre ellas destacan de un modo preponderante aquellas que tienen un papel activo en la defensa ante este estrés. Así, uno de los componentes cruciales en este repertorio inducible de mecanismos de auto-defensa de la planta se sitúa en la producción

y/o acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR, *pathogenesis related*). Las proteínas PR fueron descubiertas por Leendert C. van Loon y Albert van Kammen (1970) tras los primeros avances en las técnicas electroforéticas de proteínas en plantas de tabaco bajo una respuesta HR debido a la infección del virus del mosaico del tabaco (TMV, *tobacco mosaic virus*). Posteriormente, se encontró que estas proteínas se inducían también por infecciones de hongos y bacterias en numerosas especies de plantas (Redolfi, 1983). A día de hoy se han identificado proteínas PR en numerosas mono- y dicotiledóneas de diferentes géneros, por lo que se puede considerar que se encuentran distribuidas de un modo ubicuo en el reino de las plantas.

1.2.1.- Definición y clasificación de las proteínas PR

Con el objeto de unificar la definición de estas proteínas y de facilitar el estudio de sus funciones en la patología y la defensa del huésped, en 1980 se designó como proteína PR: “aquella proteína codificada por y para la planta huésped pero inducida únicamente ante situaciones patológicas o relacionadas con la patogénesis” (Antinow *et al.*, 1980). Actualmente, el criterio principal y necesario a la hora de establecer una proteína como PR se sitúa en que ésta se induzca durante la infección del patógeno o situaciones relacionadas, aunque pueda acumularse también en presencia de factores de estrés abiótico. La última propuesta en la clasificación de proteínas PR establece la existencia de 17 familias diferenciadas por su estructura primaria, la masa molecular, las características serológicas o la actividad biológica (Tabla 1). No obstante, recientemente se ha descubierto un grupo de proteínas con actividad antimicrobiana en *Helianthus annuus* y *Amaranthus caudatus* a la que de modo eventual se ha designado como familia PR-18 (van Loon *et al.*, 2006).

1.2.2.- Características bioquímica y funcionalidad de las proteínas PR

La mayoría de las proteínas PR se distinguen por unas propiedades bioquímicas específicas como una baja masa molecular (6-43 kDa), su extractabilidad y estabilidad a valores de pH ácido (< 3), su termoestabilidad o su alta resistencia a la acción de proteasas. Por otro lado, las proteínas PR presentan una localización celular dual (vacuolar y apoplástica), siendo el espacio extracelular de la planta su principal punto de acumulación. Asimismo, cada familia de proteínas PR muestra isoformas ácidas y básicas, situándose generalmente en el apoplasto y la vacuola respectivamente. Igualmente, se ha detectado la presencia de estas proteínas en todos los órganos de las plantas, desde las raíces a las flores, siendo especialmente abundantes en las hojas (van Loon, 1999).

La inducción de proteínas PR durante el desarrollo de la respuesta SAR (Kassanis *et al.*, 1974; van Loon, 1975; Ward *et al.*, 1991), la presencia de sustratos endógeno en la pared celular de determinados fitopatógenos para ciertas proteínas PR o la actividad hidrolítica o antifúngica *in vitro* de alguna de ellas (Kauffmann *et al.* 1987; Legrand *et al.*, 1987; Mauch *et al.*, 1988b) llevaron a la conclusión inicial de que las proteínas PR presentaban un claro papel defensivo. En este sentido, como puede verse en la Tabla 1, muchas de ellas presentan una significativa actividad antifúngica, apoyando esta funcionalidad. Sin embargo, también se ha observado que algunos miembros de algunas clases no muestran una actividad antifúngica evidente. En este sentido, se

ha sugerido que determinadas proteínas PR poseen funciones fisiológicas específicas asociadas al desarrollo de la planta (van Loon, 1999; Veronese *et al.*, 2003).

Por otro lado, la secuenciación del genoma de muchas especies de plantas está revelando que las diferentes clases de proteínas PR implican una gran cantidad de genes. En este sentido, apoyándose en estos datos del genoma, han sido revisadas exhaustivamente las familias PR-1, PR-6, PR-12, PR-13 y PR-14 (van Loon y van Strien, 1999; Yokoyama y Nishitani, 2004; Sels *et al.*, 2008). Las evidencias experimentales de estos estudios apoyan la noción de que las respuestas de defensa únicamente implican la expresión de unos pocos genes de cada clase de proteínas PR. Asimismo, muestran como muchos genes *PR* se expresan específicamente en determinados tejidos o que muchas proteínas PR tienen otras funciones aparte de las asociadas a la defensa. Por tanto, todos estos hallazgos plantean la cuestión de si los genes *PR* han evolucionado inicialmente para limitar el daño de los patógenos invasores o si éstos se han adaptado desde otras funciones para proporcionar un papel protector adicional. En suma, todo esto nos indica que es probable que a día de hoy sólo hayamos descubierto la punta del iceberg de la funcionalidad real de las proteínas PR en plantas.

1.2.3.- Regulación de los genes de las proteínas PR

La complejidad de los estímulos medioambientales y del desarrollo que llevan a la inducción de la proteínas PR, ha implicado que el estudio del conjunto de eventos que transcurren entre la percepción de la señal hasta la transcripción de los genes *PR* sea una área de investigación muy activa. En este sentido, mientras algunos genes *PR* se encuentran estrechamente regulados por rutas específicas, otros responden a señales divergentes, convergentes e incluso antagonistas originadas desde fuentes bióticas y abióticas (Zhang *et al.*, 1998; Romeis, 2001; Yoshioka *et al.*, 2001; Zhang y Klessig, 2001; Graham, 2005).

Concretamente, la expresión de genes *PR* y la resistencia a la infección por patógenos se encuentran modulados por una serie de moléculas que funcionan como señales secundarias. Entre éstas podemos destacar el NO, las ROS o varias hormonas vegetales como JA, ABA, SA o etileno (Grant y Loake, 2000; Feys y Parker, 2000; Glazebrook, 2001; Nurnberger y Scheel, 2001; Wendehanne *et al.*, 2001). La regulación transcripcional de la expresión de los genes *PR* incluye varios *cis*-elementos como las cajas W (T^{*}TGACC o TGAC-[N]_x-GTCA), las cajas GCC en tandem (AGCCGCC), las secuencias análogas a MRE (A[A/C]C[A/T]A[A/C]C), las cajas G (CACGTG) o los elementos sensibles a SA (TTCGACCTCC). Dentro de éstos, destaca el estudio detallado de los dos primeros, dado su profunda implicación en la regulación de genes *PR* (Zhu *et al.*, 1996; Rushton *et al.*, 1998). En este sentido, las proteínas de unión a las cajas W son conocidas como proteínas de la familia WRKY dado que su secuencia consenso es WRKYGQK. El extremo C-terminal de estos factores de transcripción consiste en un dominio dedo de zinc que les permite establecer interacciones proteína-proteína o DNA-proteína (Rushton *et al.*, 1996). Por otro lado, las proteínas que se unen específicamente a las cajas GCC se denominan EREBP (*ethylene-responsive element binding protein*) y la acumulación de sus transcritos está inducida por el etileno (Ohme-Takagi y Shinshi, 1995). Aunque existe un considerable entrecruzamiento entre las

diferentes rutas de señalización reguladas por estos mensajeros secundarios, se pueden extraer algunas observaciones generales sobre la señalización de las respuestas de defensa. Por un lado, la defensa asociada a patógenos necrotróficos y herbívoros tiende a estar mediada por etileno o JA, mientras que las respuestas a patógenos biotróficos se encuentran habitualmente reguladas por SA (Howe and Jander, 2008). Por otro lado, el etileno y el JA parecen actuar en rutas diferentes a las del SA, induciendo genes que codifican proteínas PR básicas, tioninas y defensinas (Feys y Parker, 2000; Glazebrook, 2001).

1.3.- Quitinasas (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11)

Las quitinasas (quitodextrinasas; 1,4- β -poli-N-acetilglucosaminidasas; poli- β -glucosaminidasas; o β -1,4-poli-N-acetilglucosaminidasas) son glicosil hidrolasas que catalizan la ruptura hidrolítica de los enlaces 1,4- β -glucosídicos presentes en biopolímeros de N-acetilglucosamina (NAG), siendo su principal sustrato la quitina (Collinge *et al.*, 1993). La quitina $[(C_8H_{13}NO_5)_n]$ es uno de los polímeros naturales más abundantes en la naturaleza tras la celulosa (Brzeski, 1987; Ornum, 1992) y, como esta última, se dispone en cadenas no ramificadas. Este homopolímero insoluble es un componente esencial de muchos organismos, encontrándose en las paredes celulares de los hongos o el exoesqueleto de los artrópodos como el caparazón de determinados crustáceos como cangrejos o gambas o la cutícula de nematodos e insectos (Merzendorfer y Zimoch, 2003; Theis y Stahl, 2004; Kramer y Muthukrishnan, 2005). Sin embargo, la quitina no ha sido detectada en plantas superiores, vertebrados y procariotas (Cohen-Kupiec y Chet, 1998). No obstante, se ha observado la presencia de NAG como componente de algunas proteínas y lípidos en plantas. En este sentido, se han identificado unidades NAG en glicolípidos de paredes celular secundarias (Benhamou y Asselin, 1989) o arabanigalactanos proteicos con cantidades apreciables de NAG en el apoplasto de zanahorias (van Hengel *et al.*, 2001; van Hengel *et al.*, 2002). Asimismo, se han descrito diferentes moléculas señalizadoras que incluyen este aminoazúcar en la interacción entre plantas y microorganismos (Côté y Hahn, 1994; Geurts y Franssen 1996; Xie *et al.*, 1999).

Tabla 1. Familias de PRs y su funcionalidad

Familia	M_r (kDa)	Actividad biológica	Objetivo	Nombre gen	Fuente bibliográfica
PR-1	14-17	Desconocida (antifúngica)	Membrana celular	<i>Ypr1</i>	Antinow <i>et al.</i> , (1980)
PR-2	25-35	1,3- β -Glucanasa (antifúngica)	1,3- β -Glucano (pared celular)	<i>Ypr2 [Gns2('Glb')]</i>	Antinow <i>et al.</i> , (1980)
PR-3 / PR-Q ^x	25-40	Quitinasa clase I, II, IV, V, VI, VII (antifúngica)	Quitina (pared celular)	<i>Ypr3, Chia</i>	van Loon (1982)
PR-4	13-19	Quitinasa clase I, II (antifúngica)	Quitina (pared celular)	<i>Ypr4, Chid</i>	van Loon (1982)
PR-5	22-26	Análogo a taumatina (antifúngica)	Membrana celular	<i>Ypr5</i>	van Loon (1982)
PR-6	6-13	Inhibidor de proteínasa	Proteínasa	<i>Ypr6, Pis ('Pirl')</i>	Green y Ryan, 1972
PR-7	69	Endoproteínasa	No definido	<i>Ypr7</i>	Vera y Conejero, 1988
PR-8	28-30	Quitinasa clase III (antifúngica)	Quitina (pared celular)	<i>Ypr8, Chib</i>	Métraux <i>et al.</i> , 1988
PR-9	39-40	Peroxidasa de síntesis de lignina	Actividad indirecta	<i>Ypr9, Prx</i>	Lagrimini <i>et al.</i> , 1987
PR-10	17-18	Análogo a ribonucleasa (antifúngica)	ARN del patógeno	<i>Ypr10</i>	Somssich <i>et al.</i> , 1986
PR-11	40-43	Quitinasa clase V (antifúngica)	Quitina (pared celular)	<i>Ypr11, Chic</i>	Melchers <i>et al.</i> , 1994
PR-12	5,6	α -Defensina (antifúngica)	Membrana celular	<i>Ypr12</i>	Terras <i>et al.</i> , 1992
PR-13	14	Tionina (antifúngica)	Membrana celular	<i>Ypr13, Thi</i>	Epple <i>et al.</i> , 1995
PR-14	7-12	Proteína de transferencia de lípidos	Lípidos	<i>Ypr14, Ltp</i>	García-Olmedo <i>et al.</i> , 1995
PR-15	22-26	Oxalato oxidasa (antifúngica)	Membrana celular	<i>Ypr15</i>	Zhang <i>et al.</i> , 1995
PR-16	22-26	Análogo a oxalato oxidasa	Membrana celular	<i>Ypr16</i>	Wei <i>et al.</i> , 1998
PR-17	27	Desconocida (antifúngica)	Desconocido	<i>Ypr17</i>	Okushima <i>et al.</i> , 2000

^x Las diferentes nomenclaturas son equivalentes. El término PR-Q fue el originalmente usado tras su purificación en hojas tabaco, persistiendo aun en la bibliografía a pesar de la sistematización realizada.

Las quitinasas se han encontrado en un heterogéneo rango de organismos. Entre ellos encontramos bacterias, particularmente en actinomicetos (de Boer *et al.*, 1998, Felse y Panda, 1999; Saito *et al.*, 1999), hongos (Sahai y Manocha, 1993; Rast *et al.*, 2003), insectos (Kramer y Muthukrishnan, 2005), plantas superiores (Collinge *et al.*, 1993; Iseli *et al.*, 1996a; Gomez *et al.*, 2002), ciertos virus (Hiramatsu *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2005) o incluso en el ser humano (Hakala *et al.*, 1993; Boot *et al.*, 1995; Boot *et al.*, 2001; Comabella *et al.*, 2010). Dependiendo del organismo de origen, esta enzima juega un importante papel en un amplio conjunto de funciones a nivel del desarrollo, la morfología o la fisiología del organismo. Mientras que en bacterias las quitinasas están implicadas en la nutrición y el parasitismo (Svitil *et al.*, 1997; Ruiz-Sanchez *et al.*, 2005), en hongos e invertebrados también se involucran en la morfogénesis (Sahai y Manocha, 1993; Adams, 2004). En el caso de plantas, su principal función se ha situado tradicionalmente dentro del mecanismo de defensa frente al ataque de patógenos (Bowls *et al.*, 1990; Patil *et al.*, 2000).

1.3.1.- Clasificación de las quitinasas

Las plantas expresan un gran número de isoenzimas quitinasa y muchas de ellas se inducen a lo largo de las reacciones de defensa contra patógenos. Por ello, estas enzimas se han clasificado como proteínas PR. En este sentido, en la Tabla 2 se puede observar como las quitinasas de plantas han sido clasificadas de acuerdo a su secuencia en cuatro familias dentro de las familias de proteínas PR (van Loon *et al.*, 1994; Neuhaus *et al.*, 1996). Por un lado, la familia PR-3 o PR-Q incluye aquellas quitinasas de clase I, II, IV, V, VI y VII, las cuales también dan lugar a la familia 19 de glicosil hidrolasas. Las quitinasas de clase III pertenecen a la familia PR-8 y las quitinasas de clase V^{*} con actividad exoquitinasa a la familia PR-11 (Melchers *et al.*, 1994). Ambas familias pertenecen a la familia 18 de glicosil hidrolasas. Por último, existe una familia adicional (PR-4), que comprende algunas proteínas con baja actividad hidrolítica (Linthorst *et al.*, 1991; Ponstein *et al.*, 1994). En este sentido, podemos observar como dentro de esta clasificación los componentes individuales de cada familia presentan otras nomenclaturas alternativas que aluden a su estructura primaria o a su adscripción a una familia particular de las glicosil-hidrolasas. A continuación, vamos a especificar las características de estos sistemas de clasificación alternativos, incluyendo el basado en el mecanismo de hidrólisis

1.3.1.1.- Estructura primaria

Las quitinasas de plantas también pueden sistematizarse en siete clases propias (clase I-VII) de acuerdo a su composición de aminoácidos y diferencias estructurales (Fig. 2). En este sentido, aparte de la homología en la estructura primaria, las características determinantes para asignar una quitinasa a una clase particular incluyen: el dominio N-terminal, la localización celular de la enzima, su punto isoeléctrico, el péptido señal y sus inductores (Iseli *et al.*, 1996b; Neuhaus *et al.*, 1999). No obstante, señalar que no existe una correlación aparente entre las diferentes clases de quitinasas y su presencia en determinadas especies de plantas, órganos o tejidos.

Tabla 2. Nomenclatura de las quitinasas de plantas

Familia de glicosil hidrolasa	Familia proteína PR	Clase quitinasa ^x	Nombre gen
19	PR-3	I	<i>Chia1</i>
		II	<i>Chia2</i>
		IV	<i>Chia4</i>
		V	<i>Chia5</i>
		VI	<i>Chia6</i>
		VII	<i>Chia7</i>
18	PR-8	III	<i>Chib1</i>
	PR-11	V*	<i>Chic1</i>
	PR-4	I*	<i>Chid1</i>
		II*	<i>Chid2</i>

^x Las diferentes nomenclaturas son esencialmente equivalentes, con la excepción del número de clase. Por ejemplo, la clase I, II y V sigue usándose de forma simultánea para proteínas de dos familias diferentes. Por tanto, resulta conveniente indicar tanto la familia como la clase para evitar cualquier clase de confusión.

Las quitinasas de clase I son enzimas que presentan una masa molecular que oscila entre 32 y 34 kDa, caracterizándose por la presencia en el extremo N-terminal de un dominio CBD (*chitin binding domain*, dominio de unión a quitina). Éste módulo de aproximadamente 40 aminoácidos, rico en cisteínas y con un alto grado de identidad con el dominio heveína, presenta una gran influencia en las propiedades de unión a la quitina (Iseli *et al.*, 1993). Como puede observarse en la Figura 2, el dominio CBD se separa del dominio catalítico por una zona espaciadora HR (*hinge region*, región conectora) de una gran variabilidad en su longitud y secuencia aminoacídica. Tras el dominio catalítico, consistente en una extensa región altamente conservada dentro de las glicosil hidrolasas de la familia 19, se encuentra el péptido CTP (*carboxy terminal propeptide*, propéptido carboxi terminal) en el extremo C-terminal. Éste presenta una reducida longitud y una alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos en su secuencia. Aunque tradicionalmente se ha caracterizado las quitinasas de clase I como proteínas básicas localizadas en el espacio vacuolar de la planta, gracias a la presencia del péptido CTP (Neuhaus *et al.*, 1991), existe una subclase dentro de la clase I (clase Ib) que engloba un grupo de enzimas quitinasa definidas por un pI ácido, la falta de dicho propéptido y su excreción al medio extracelular (Van Damme *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1994; Inui *et al.*, 1996; Arie *et al.*, 2000). Por otro lado, mientras que las quitinasas de clase I se encuentran restringidas a fuentes vegetales, las enzimas asociadas a la clase II han sido detectadas en el medio extracelular de plantas y bacterias. Estas quitinasas presentan una masa molecular que oscila entre 27 y 28 kDa y carecen del dominio

CBD y del péptido CTP. Sin embargo, muestran un elevado grado de similitud en la secuencia y en la estructura con el dominio catalítico de las quitinasas de clase I. Dentro de la clase II, las quitinasas inducidas por patógenos dan lugar a una subclase distinta (clase IIb), presentando una delección característica en el dominio catalítico. Por otro lado, no resulta sorprendente observar como la genealogía de proteínas quitinasa concluye que los genes de las clases I y II han evolucionado a partir de un mismo gen ancestral (Araki y Torikata, 1995). En este sentido, otros autores defienden la idea de que esta clase representa un grupo designado artificialmente dentro de las quitinasas de plantas, sin ningún tipo de relevancia evolutiva o funcional específica (Ponath *et al.*, 2000).

La clase III de quitinasas agrupa a enzimas de bacterias, hongos, plantas y animales (Hamel *et al.*, 1997) con una masa molecular que oscila entre 28 y 30 kDa, no observándose ninguna similitud en su secuencia aminoacídica con las otras clases de quitinasas. En algunos casos presenta la peculiaridad de una actividad enzimática bifuncional, pudiendo actuar como quitinasas y lisozimas (Brunner *et al.*, 1998).

Aunque las quitinasas de clase IV tienen características similares a las de clase I, éstas son significativamente más pequeñas debido a una serie de delecciones: una en el dominio CBD, varias en el dominio catalítico (alrededor de 22 aminoácidos) y otra en el péptido CTP (Araki y Torikata, 1995; Tiffin, 2004; Ubhayasekera *et al.*, 2009). En este sentido, un estudio de las quitinasas de *A. thaliana* indicó que algunos de los residuos más importantes en la unión al sustrato son consistentemente diferentes entre las enzimas de clase I y clase IV (Passarinho y de Vries, 2002). El precursor de aglutinina de ortiga (precursor UDA) es el único miembro de la clase V. Esta proteína, caracterizada por la presencia de dos módulos CBD en tandem, tiene una actividad hidrolítica residual, lo cual está probablemente causado por la mutación de sus dos residuos catalíticos (Fig. 2). En la bibliografía y bases de datos también se observa frecuentemente la designación de la clase V para otra clase de quitinasas de plantas incluidas en la familia 18 de las glicosil hidrolasas (Melchers *et al.*, 1994; Taira *et al.*, 2009). Estas enzimas exhiben una escasa relación con otras quitinasas de plantas y muestran una moderada similitud con exoquitinasas bacterianas. La clase VI también incluye un solo ejemplo, una enzima aislada en remolacha, y posee un dominio catalítico similar a las quitinasas de clase I. Sus particularidades son las numerosas truncaciones en el dominio CBD y la presencia de un largo dominio HR rico en prolina entre las dos regiones funcionales (Berglund *et al.*, 1995). Por último, las quitinasas de clase VII están caracterizadas por la existencia de un dominio catalítico homólogo a las quitinasas de clase IV y la ausencia del módulo CBD (Li *et al.*, 2001).

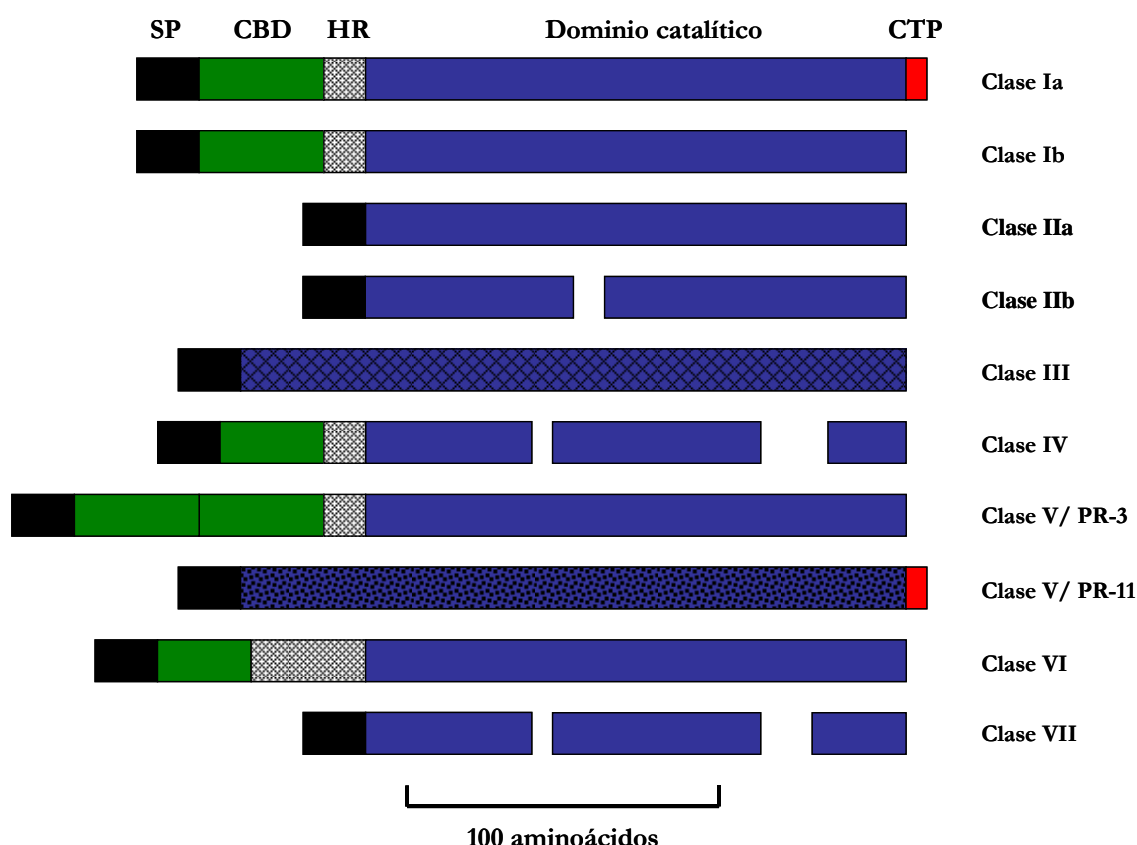


Figura 2. Representación esquemática de las diferencias estructurales entre las clases de quitinasas en las plantas angiospermas. Los espacios mostrados en las quitinasas de clase II, IV y VII, comparadas con las de clase I, representan las delecciones identificadas. La textura diferente del dominio catalítico de las quitinasas de clase III y V/PR-11 indica su divergencia con el de resto de clases. SP (*Peptide signal*, péptido señal); CBD (*Chitin binding domain*, dominio de unión a quitina); HR (*Hinge region*, región conectora), CTP (*Carboxy terminal propeptide*, propéptido carboxi terminal).

1.3.1.2.- Glicosil hidrolasas

Utilizando la secuencia de aminoácidos de las glicosil hidrolasas, Henrissat y Bairoch (1993) agruparon las quitinasas de las plantas dentro de las familias 18 y 19 (Tabla 2). La información de ambas familias se encuentra disponible en el sistema de clasificación CAZy, una base de datos que reúne todas aquellas enzimas implicadas en la síntesis, degradación y modificación de carbohidratos complejos y glicoconjugados (Cantarel *et al.*, 2008). La familia 18 de las glicosil hidrolasas (GH18) corresponde a un conjunto de quitinasas ancestrales encontradas en todos los reinos de la vida, desde bacterias a animales y hongos. Sin embargo, se ha identificado un número relativamente pequeño de quitinasas GH18 procedentes de plantas. En este sentido, la familia GH18 de quitinasas se divide en dos clases generales: una clase está asociada a plantas y se encuentra caracterizada por una actividad endoquitinasa que produce productos de longitud variable, y la otra clase se relaciona con bacterias, mostrando una actividad quitobiosidasa (Andersen *et al.*, 2005; van Aalten *et al.*, 2001). La mayor parte de las quitinasas de origen vegetal se encuentran clasificadas en la familia 19 (GH19). Hasta hace diez años sólo se

había observado la presencia de esta familia de quitinasas en plantas superiores. Sin embargo, los progresos recientes en los proyectos de secuenciación del genoma han revelado su existencia en ciertas bacterias y nematodos (Waterston *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 1999; Ueda *et al.*, 2003).

Las quitinasas GH18 y GH19 no sólo difieren en su secuencia, sino también en la estructura tridimensional de su módulo catalítico y su mecanismo de catálisis sobre el enlace glucosídico (Davies y Henrissat, 1995). Así, las quitinasas de plantas pertenecientes a la familia 18 presentan un plegamiento (α/β)₈ o barril TIM en su dominio catalítico y utilizan un mecanismo de doble desplazamiento asociado a sustrato (Fig. 3). Este mecanismo de reacción requiere la presencia de un residuo ácido en el centro activo (generalmente Glu) y provoca la retención de la configuración anomérica del nuevo extremo reductor formado (van Scheltinga *et al.*, 1993; Brameld *et al.*, 1998). Sin embargo, el dominio catalítico de las quitinasas GH19 presenta un aspecto compacto, un elevado contenido en hélice α y tres enlaces disulfuro conservados. De este modo, el teórico bolsillo de unión al sustrato estaría compuesto por dos hélices α y una lámina β de tres hebras. Asimismo, se han encontrado ciertas similitudes estructurales con lisozimas y quitosanasas, aun no compartiendo homología en la secuencia (Harth *et al.*, 1995). En este sentido, estas analogías en el plegamiento llevaron a Monzingo *et al.* (1996) a concluir que las quitinasas GH19 de plantas y determinadas lisozimas de animales habían surgido de un ancestro común por evolución divergente. La hidrólisis efectuada por las quitinasas GH19 implica un mecanismo general ácido-base y un único desplazamiento, provocando la inversión del carbón anomérico (Fig. 3). En los miembros de esta familia se ha postulado la necesaria presencia de dos residuos ácidos enfrentados para el desarrollo de la catálisis; uno de ellos actuaría como un ácido general (donando un protón al enlace glucosídico), y el otro como una base general (promoviendo un ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua y estabilizando el intermedio de reacción cargado). En contraste con la familia GH18 de quitinasas, no se han resuelto hasta fechas recientes estructuras de quitinasas GH19 unidas a sustratos. Debido a ello, la localización de su sitio activo ha sido adjudicada sistemáticamente a dos residuos Glu altamente conservados e idóneos teóricamente para la unión e hidrólisis de la cadena de quitina (Hollis *et al.*, 1997; Fukamizo, 2000; Hahn *et al.*, 2000; Kezuka *et al.*, 2004; Ubhayasekera *et al.*, 2007; Ubhayasekera *et al.*, 2009). Aunque todavía no han sido añadida esta información a la base de datos CAZy, los últimos resultados cristalográficos de una quitinasa GH19 de papaya unida a dos moléculas de NAG confirman la función de estos dos residuos ácidos en el mecanismo de reacción propuesto (Huet *et al.*, 2008).

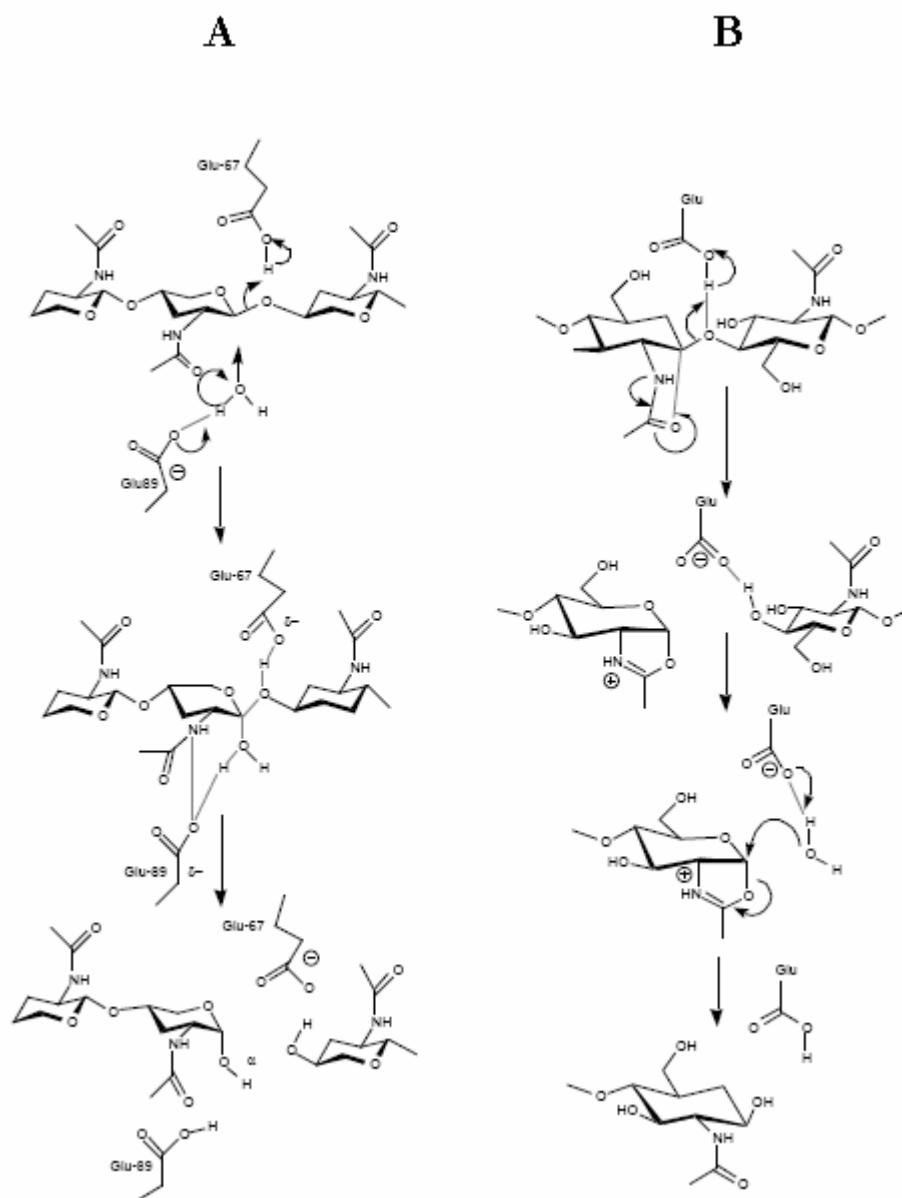


Figura 3. Mecanismo catalítico de las quitinasas de las familias 18 y 19 (Fukamizo, 2000). (A) Mecanismo de único desplazamiento con inversión de la configuración del carbono anomérico propuesto para las quitinasas GH19. (B) Mecanismo de doble desplazamiento con retención de la configuración del carbono anomérico planteado para las quitinasas GH18.

1.3.1.3.- Mecanismo de hidrólisis

Otro de los criterios seguidos es el recomendado por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (I.U.B.M.B), el cual se centra en la reacción de hidrólisis catalizada por esta enzima (Fig. 4). En un principio, todas las enzimas capaces de catalizar la degradación de quitina o quitooligosacáridos mediante la hidrólisis del enlace 1,4- β -glucosídico entre unidades de NAG son definidas como enzimas quitinolíticas y se diferencian de acuerdo a los productos finales generados del siguiente modo:

- **Endoquitinasas** (EC 3.2.1.14). Son las enzimas a las cuales corresponde la definición tradicional de quitinasas según la nomenclatura clásica (Webb y NC-ICBMB, 1992). Éstas fragmentan aleatoriamente los enlaces internos de la quitina y quitooligosacáridos, generando diferentes multímeros de baja masa molecular de NAG, como quitotriosa, quitotetraosa o el dímero diacetilquitobiosa (Sahai y Manocha, 1993; Botha *et al.*, 1998).
- **Quitobiosidasas**. Esta denominación surgió tras observar una peculiar actividad exoquitinasa en bacterias (Harman *et al.*, 1993; Tronsmo y Harman, 1993). Corresponde a enzimas que catalizan de un modo sucesivo la liberación exclusiva de diacetilquitobiosas desde el extremo no reductor de quitina y quitooligosacáridos. El término quitobiosidasa no se encuentra oficialmente reconocido con un número EC, derivándose su definición por analogía con la nomenclatura de la enzima celulolítica celulosa 1,4- β -celobiosidasa (EC 3.2.1.91) (Webb y NC-ICBMB, 1992). No obstante, varios autores recomiendan usar con precaución este último término, puesto que la identificación inequívoca puede verse comprometida con el uso de los sustratos sintéticos habituales (Robbins *et al.*, 1988; Mayer *et al.*, 1996b; Mayer y Rast, 1997).
- **1,4- β -(N)-acetilhexosaminidasas** (EC 3.2.1.52). Estas enzimas hidrolizan la quitina y quitooligosacáridos desde su extremo no reductor, generando únicamente monómeros de NAG. En este sentido, estas enzimas representan el otro modelo de exo-mecanismo dentro de las quitinasas (Horsch *et al.*, 1997). Asimismo, estas enzimas pueden degradar los sustratos sintéticos pNP-GlcNAc y 4MU-GlcNAc, liberando productos detectables mediante técnicas espectroscópicas. Por otro lado, hay que tener en cuenta que aunque presentan la capacidad de hidrolizar cadenas de oligosacáridos de diferente tamaño, su velocidad de reacción es mayor frente a mono y disacáridos, disminuyendo considerablemente la constante de especificidad al incrementarse la longitud de la cadena. Este tipo de enzimas rompen los enlaces 1,4- β glicosídicos del extremo no reductor de los oligómeros de quitina, liberando monómeros de NAG. En este sentido, hay que tener en cuenta que aunque presentan la capacidad de hidrolizar cadenas de oligosacáridos de diferente tamaño, la velocidad de reacción es mayor frente a mono y disacáridos, disminuyendo considerablemente la constante de especificidad al incrementarse la longitud de la cadena (Patil *et al.*, 2000).

En la bibliografía es habitual observar como la clasificación únicamente discrimina entre endoquitinasas y exoquitinasas. Sin embargo, la utilización de este último término ha resultado, y resulta todavía, sumamente confusa. Mientras algunos autores consideran que sólo se puede definir como exoquitinasas a las enzimas 1,4- β -(N)-acetilhexosaminidasas (Boller, 1988), otros consideran que únicamente debe usarse para las quitobiosidasas (Roberts y Selitrennikoff, 1988; Manocha y Balasbramanian, 1994; Hodge *et al.*, 1995; Horsch *et al.*, 1997). Incluso existen trabajos que utilizan una definición de consenso, estableciendo como exoquitinasas aquellas enzimas quitinolíticas que no presenten actividad endoquitinasa (Kunz *et al.*, 1992; Wurms *et al.*, 1997). Por todo ello, en este trabajo hemos decidido prescindir del uso del término ‘exoquitinasa’, especificando en cada caso el mecanismo de hidrólisis según las tres categorías arriba reseñadas.

Los tipos de quitinasas más estudiados en plantas corresponden a las endoquitinasas (Boller *et al.*, 1983, Roberts y Selitrennikoff, 1988; Broglie y Broglie, 1994). Asimismo, muchas de ellas muestran algún grado de actividad lisozima (EC 3.2.1.17), hidrolizando los enlaces 1,4- β -glucosídico entre el ácido N-acetilmurámico y los residuos de NAG del peptidoglicano (Trudel y Asselin, 1989; Schultze *et al.*, 1998). Por otro lado, en la naturaleza, la acción sinérgica y consecutiva de estos tres clases de enzimas con actividad quitinolítica permite la total degradación de la quitina en monómeros de NAG libres (Patil *et al.*, 2000).

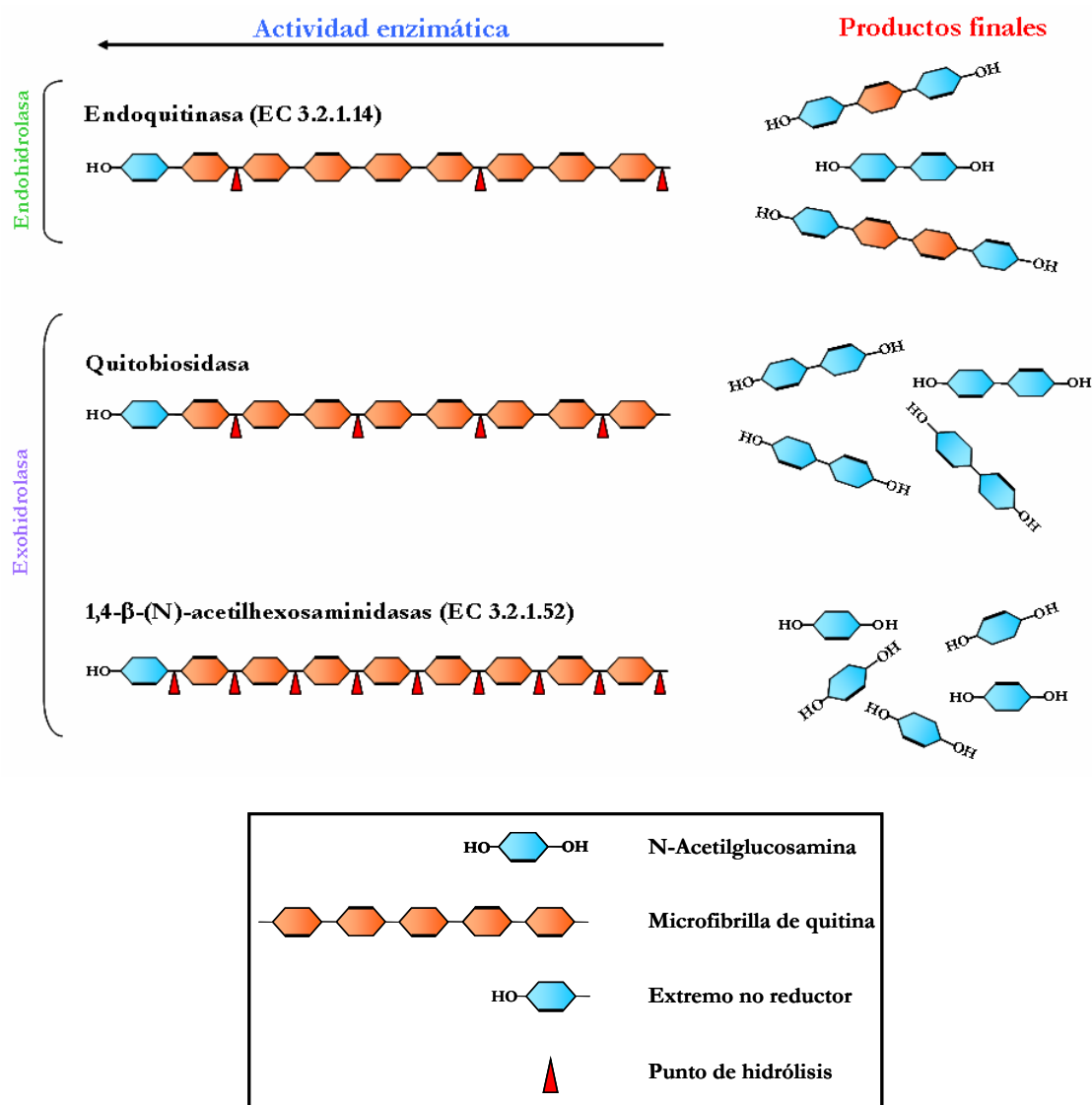


Figura 4. Mecanismos de hidrólisis de las enzimas quitinolíticas.

1.3.2.- Estructura y regulación de los genes de las quitinasas

Con el objeto de clarificar la nomenclatura de genes de quitinasa y para obtener un paralelismo con la nomenclatura de proteínas PR, Neuhaus *et al.* (1996) clasificaron las quitinasas en cuatro grandes familias de genes (*Chia*, *Chib*, *Chic*, *Chia*) (Tabla 2). Por otro lado, aunque se ha clonado un gran número de DNAC correspondientes a quitinasas de la familia PR-3, son pocas

las secuencia de genes *Chia* obtenidas. La mayoría de éstas se caracterizan por la presencia de dos intrones, aunque algunos genes de quitinasas presentan uno sólo o carecen de ellos (Neuhaus, 1999). La estructura genómica de distintas quitinasas GH19 muestra que sus genes pueden existir como 1 ó 2 copias por genoma haploide (Ancillo *et al.*, 1999) o mostrar una organización más compleja en forma de familias multigénicas (Chlan y Bourgeois, 2001). La expresión génica de esta clase de quitinasas es compleja y varía en las diferentes especies de plantas. No obstante, estos genes muestran una inducción diferencial en distintas plantas ante el ataque de patógenos o al tratamiento con etileno, SA, JA y elicitores fúngicos como quitosano. Por otro lado, la ruta de señalización que media la expresión de genes de quitinasas inducida por elicitores se encuentra altamente conservada en especies sumamente distantes filogenéticamente (Wu *et al.*, 1997).

Los genes de quitinasas PR-3 están regulados a nivel transcripcional. La evidencia más clara de esta regulación se encuentra en los estudios de los promotores del gen de quitinasa de clase I de alubia. Este gen es activado por etileno, patógenos fúngicos y elicitores en forma de oligosacáridos (Broglie *et al.*, 1986; Broglie *et al.*, 1989; Roby *et al.*, 1990). El papel del etileno ha sido también estudiado en promotores de genes de quitinasa de clase I de tabaco (Shinsi *et al.*, 1995). Las cajas GCC en tandem son el elemento responsable de esta elicitación por etileno, estando implicadas en la inducción sistémica de quitinasas básica y otros genes de proteínas PR (Hart *et al.*, 1993; Ohme-Takagi y Shinshi, 1995). Por último, diferentes análisis Northern e inmunoensayos han demostrado en un gran número de plantas y cultivos celulares que la síntesis de quitinasas se induce en respuesta a varios factores de estrés biótico (Suzuki *et al.*, 1995; Gerhardt *et al.*, 1997) y abiótico (Brederode *et al.*, 1991; Schraudner *et al.*, 1992; Hon *et al.*, 1994; Hamel y Bellemare, 1995; Tamas *et al.*, 1997; Arie *et al.*, 2000; de los Reyes *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2002; Pihakaski-Maunsbach *et al.*, 2003; El Ghaouth *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 2006; Békésiová *et al.*, 2008; Ballester *et al.*, 2010).

Por otro lado, los genes de quitinasas de clase III suelen carecer de intrones (Bokma *et al.*, 2001; Shih *et al.*, 2001), existiendo como copias únicas (Nielsen *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1999; Regalado *et al.*, 2000; Goormachtg *et al.*, 2001) o en forma de pequeñas familias multigénicas (Bokma *et al.*, 2001). La mayor parte de estas quitinasas se inducen cuando las plantas son infectadas por patógenos (Métraux y Boller, 1986; Awade *et al.*, 1989; Lawton *et al.*, 1992; Nielsen *et al.*, 1993; Kragh *et al.*, 1993; Regalado *et al.*, 2001). Aunque la abundancia relativa de estas enzimas en plantas infectadas varía entre las diferentes especies de plantas, se ha sugerido que las quitinasas de clase III son una característica habitual de la respuesta SAR frente al ataque de patógenos (Lawton *et al.*, 1994b). No obstante, también se ha observado la inducción de los genes de estas quitinasas en respuesta a distintos tipos de estrés abiótico (Regalado *et al.*, 2001).

1.3.3.- Funcionalidad de las quitinasas

Las enzimas quitinolíticas presentan una gran diversidad de funciones en diferentes procesos biológicos, tal y como es la degradación de la cutícula en crustáceos, la protección frente a ataques de hongos y bacterias u otros procesos que incluyan la hidrólisis de polisacáridos

quitinosos. En este sentido, diferentes estudios bioquímicos han establecido los papeles defensivos y atacantes de las quitinasas en distintos organismos. Por un lado, las quitinasas producidas por patógenos fúngicos y bacterianos de invertebrados compuestos de quitina tienen una función dual en la destrucción del exoesqueleto del huésped, proporcionando nutrientes y facilitando la exposición de otros componentes estructurales (Soderhall y Unestam, 1975; Dackman *et al.*, 1989). Además, las quitinasas juegan un importante papel en la morfogénesis de levaduras e insectos, facilitando la separación celular durante el crecimiento (Kuranda y Robbins, 1991) o promoviendo la digestión de polisacáridos estructurales del exoesqueleto (Fukamizo, 2000).

La mayor parte de plagas agrícolas están compuesta por hongos (ascomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos) e insectos que presentan cantidades apreciables de quitina en sus paredes celulares y exoesqueletos (Collinge *et al.*, 1993). Este hecho sumado a que las plantas no poseen este compuesto en su estructura ha llevado a la asunción de que las quitinasas de plantas están implicadas en los mecanismos de defensa contra el ataque de patógenos. Estas enzimas pueden actuar directamente, gracias a sus propiedades antifúngicas, o indirectamente a través de la liberación de quitoooligosacáridos capaces de inducir un amplio elenco de respuestas defensivas en plantas (Yamada *et al.*, 1993; Kuchitsu *et al.*, 1995; Lorito *et al.*, 1996; Inui *et al.*, 1997; Suárez *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2002; Akimoto-Tomiyama *et al.*, 2003). Se han obtenido numerosas evidencias sobre la capacidad de las quitinasas de plantas y frutos en la degradación de la pared celular de hongos y en la inhibición del crecimiento fúngico, especialmente si son combinadas con 1,3- β -glucanasas de clase I (Schlumbaum *et al.*, 1986; Mauch *et al.*, 1988b; Ludwig y Boller, 1990; Arlorio *et al.*, 1992; Sela-Buurlage *et al.*, 1993; Yun *et al.*, 1996; Derckel *et al.*, 1996; Giri *et al.*, 1998; Velazhahan *et al.*, 2000; Fernandez-Caballero *et al.*, 2009). Asimismo, se ha detectado la expresión de un gran número de genes de quitinasa inducidos durante la infección por fitopatógenos y se ha observado como se acumulan alrededor de las paredes celulares de las hifas en los puntos de infección *in vivo* (Wubben *et al.*, 1992). Además, varias plantas transgénicas que sobreexpresan quitinasas se ha detectado una menor susceptibilidad a la infección por hongos que contengan quitina en su pared celular (Broglie *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 1994; Jongedijk *et al.*, 1995; Jach *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1996; Tabei *et al.*, 1998). Sin embargo, hay que tener en cuenta que sólo algunas isoenzimas quitinasa son inducidas específicamente en respuesta a un determinado fitopatógeno y que únicamente algunas de ellas son capaces de inhibir el crecimiento del hongo (Sela-Buurlage *et al.*, 1993; Jach *et al.*, 1996; Ji *et al.*, 2000). Asimismo, en variedades resistentes a patógenos de una misma especie se observa una mayor expresión de quitinasas constitutivas y una inducción más rápida y perdurable de quitinasas específicas (Nielsen *et al.*, 1993; Lawrence *et al.*, 2000; Angelova *et al.*, 2001).

En la Figura 5 se puede observar el modelo propuesto por Mauch y Stachelin (1989) acerca de la funcionalidad dual de las quitinasas en la respuesta de defensa de las plantas frente a la colonización por fitopatógenos. Por un lado, las quitinasas secretadas al medio extracelular están implicadas en las primeras etapas de la infección, liberando oligosacáridos implicados en la transferencia de información acerca de la penetración de la hifa en el espacio intercelular

(Mauch y Staehelin, 1989; Gerhardt *et al.*, 1997). Posteriormente, estos elicitores se unen a receptores específicos que inducirán respuestas de defensa activas como la síntesis de quitinasas apoplásticas y vacuolares, nuevas proteínas PR como osmotina o taumatina, fitoalexinas y otros compuestos (Yamada *et al.*, 1993; Kuchitsu *et al.*, 1995; Lorito *et al.*, 1996; Inui *et al.*, 1997; Vander *et al.*, 1998; Akimoto-Tomiyama *et al.*, 2003; El Gueddari, 2003). A lo largo de la siguiente etapa de la infección, cuando las enzimas fúngicas digieren la pared celular de la planta y destruyen la célula, las quitinasas y 1,3- β -glucanasas vacuolares entran en acción sobre las hifas invasoras, inhibiendo de forma directa el crecimiento del hongo. Este papel de las quitinasas vacuolares, especialmente las de clase I, ha sido confirmado gracias a las evidencias de una co-evolución existente entre el sitio activo de estas enzimas y la capacidad inhibitoria de proteínas fúngicas (Bishop *et al.*, 2000).

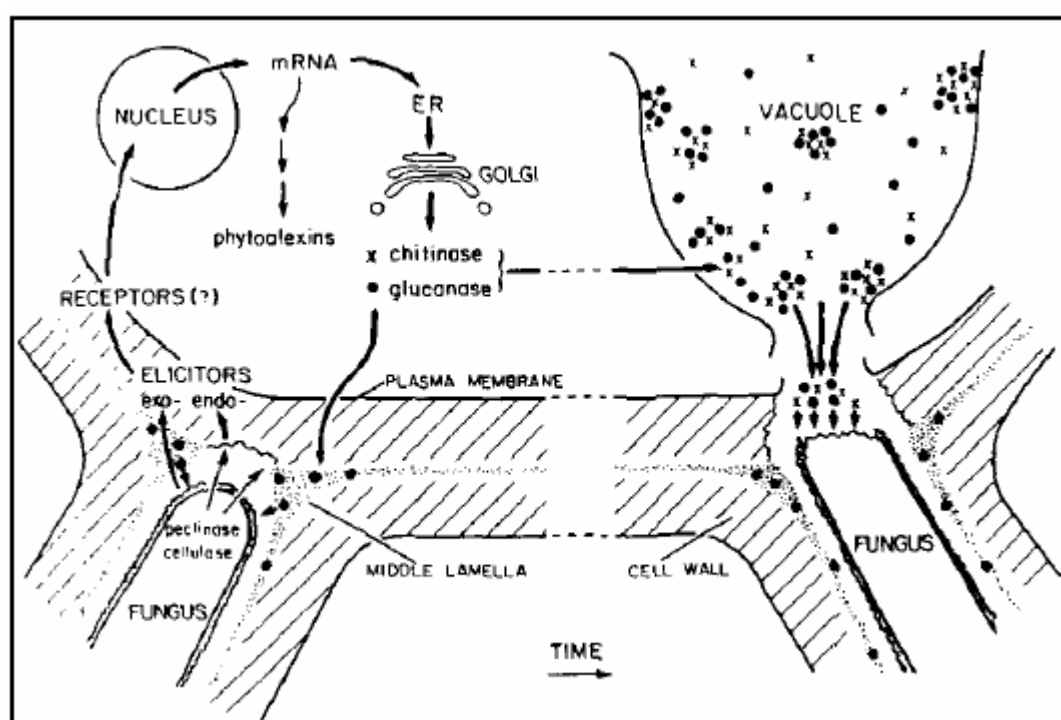


Figura 5. Modelo esquemático de las funciones de quitinasas y 1,3- β -glucanasas en la defensa de la planta contra el ataque de fitopatógenos (Mauch y Staehelin, 1989). Las quitinasas y 1,3- β -glucanasas apoplásticas liberan oligosacáridos desde la pared celular del hongo y éstos actúan como elicitores iniciadores del mecanismo de defensa de la planta. En las etapas finales, la penetración de la hifa del hongo en la célula causa la ruptura y liberación del contenido de la vacuola, cercándose el hongo con concentraciones tóxicas de enzimas hidrolíticas.

No obstante, además de su conocida actividad antifúngica, la especificidad de la expresión de algunos genes de quitinasa sugieren que estas enzimas podrían jugar un papel en las diferentes etapas del desarrollo de la planta como la senescencia, el enraizamiento, la regulación de la formación de nódulos en las raíces de leguminosas, la germinación de semillas y la embriogénesis somática (De Jong *et al.*, 1992; Hanfrey *et al.*, 1996; Salzer *et al.*, 1997; Goormachtig *et al.*, 1998; Helleboid *et al.*, 2000; Obregón *et al.*, 2001; Passarinho *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2002). En este sentido, diversas especies de plantas como *Arabidopsis*, arroz, guisante o algodón expresan quitinasas carentes de actividad hidrolítica que podrían estar relacionadas con la biosíntesis de la

pared celular (Zhang *et al.*, 2004a; Aktar Hossain *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha descrito la acumulación de quitinasas inducidas por las bajas temperaturas que presentan funciones adicionales a su actividad quitinolítica y relacionadas con la protección frente al estrés por frío (Yeh *et al.*, 2000; Fernandez-Caballero *et al.*, 2009; Kikuchi *et al.*, 2009). Asimismo, existen otros ejemplos donde quitinasas muestran otras actividades adicionales no relacionadas, como la inhibición de una α -amilasa o de una proteasa (Ary *et al.*, 1989; Guevara *et al.*, 1999). Por último, se ha observado una propiedad sumamente inusual en determinadas quitinasas de plantas, llegando a funcionar como fuentes de reserva de aminoácidos para la síntesis de proteínas (Peumans *et al.*, 2002; Avice *et al.*, 2003).

Por último, en los últimos años varios estudios han descrito la importancia de las quitinasas de clase I de diferentes frutos como el mango, la chirimoya o el tomate como potenciales alérgenos en el contexto del síndrome látex-fruta (Díaz-Perales *et al.*, 1999). En este sentido, se estima que un gran porcentaje de los pacientes alérgicos al látex están sensibilizados al polen o a varios frutos por reacciones cruzadas. La hipótesis a esta reactividad cruzada está fundamentada en que los anticuerpos IgE reconocerían epítomos similares presentes en proteínas diferentes que presentan estructuras conservadas a lo largo de la evolución. Así, la elevada similitud existente entre el dominio CBD de las quitinasas de clase I y el alérgeno Hev b 6.02 (Sowka *et al.*, 1998; Sanchez-Monge *et al.*, 1999; Díaz-Perales *et al.*, 2002) apuntaría en esa dirección.

1.4.- 1,3- β -glucanasas (PR-2)

Las 1,3- β -glucanasas (glucano 1,3- β -glucosidasas) son glicosil hidrolasas que catalizan la ruptura hidrolítica de los enlaces 1,3- β -glucosídicos presentes en β -1,3-glucanos. Este biopolímero está formado por monómeros de D-glucosa con enlaces 1,3- β y ramificaciones 1,6- β (Sonnenberg *et al.*, 1985). Al contrario que las quitinasas, el sustrato de estas enzimas es un componente ampliamente extendido en las paredes celulares de las plantas. En este sentido, el β -1,3-glucano y otros polisacáridos relacionados se han encontrado en muchas etapas especializadas del desarrollo de la planta, incluyendo la división celular (Verma y Gu, 1996), la microesporogénesis (Worrall *et al.*, 1992), en tubos del polen (Meikle *et al.*, 1991), en hipocotilos (Wong y MacLachlan, 1980), durante el desarrollo del endospermo (Brown *et al.*, 1997), a lo largo de la germinación de semillas (Vogeli-Lange *et al.*, 1994) o durante la latencia (Aloni y Peterson, 1997).

Se han descrito 1,3- β -glucanasas en bacterias, hongos, actinomicetos, algas, moluscos y plantas. En hongos y levaduras son prácticamente ubicuas (Reese y Mandels, 1959), siendo esto una consecuencia probable de la amplia disponibilidad de sustrato existente, especialmente como componente de las paredes celulares. Asimismo, las 1,3- β -glucanasas están ampliamente distribuidas en especies de plantas con semilla y han sido detectadas en niveles significativos en sus diferentes tejidos (Meins *et al.*, 1992; Simmons, 1994; Høj y Fincher, 1995).

1.4.1.- Clasificación de las 1,3- β -glucanasas

1.4.1.1.- Estructura primaria

Las 1,3- β -glucanasas en plantas existen como un conjunto de múltiples isoenzimas estructurales que varían en tamaño, punto isoeléctrico, estructura primaria, localización celular y patrón de regulación (Meins *et al.*, 1992). La información más detallada de la secuencia de esta enzima procede de clones de DNA genómico y DNAC de 1,3- β -glucanasas de tabaco. De acuerdo a la identidad de su secuencia aminoacídica, las diferentes 1,3- β -glucanasas del género *Nicotiana* han sido clasificadas en cuatro clases estructurales (clase I-IV). No obstante, todas ellas se encuentran ubicadas dentro de la familia PR-2 de proteínas (Leubner-Metzger y Meins, 1999) y de la familia 17 de las glicosil hidrolasas (Henrissat y Bairoch, 1993). Por otro lado, aunque se ha observado que otras especies de plantas como tomate o patata comparten una clasificación estructural similar (Van Kan *et al.*, 1992; Beerhues y Kombrink, 1994; Domingo *et al.*, 1994; Oh y Yang, 1995), conviene remarcar que la nomenclatura utilizada para las monocotiledóneas es diferente, catalogándose sus 1,3- β -glucanasas en cuatro subfamilias (A-D) en función de su estructura y funcionalidad (Romero *et al.*, 1998).

Si nos centramos en las dicotiledóneas, las diferentes isoenzimas 1,3- β -glucanasa se encuentran localizadas específicamente en la vacuola o bien son excretadas al apoplasto de la célula. Todas ellas muestran un péptido señal hidrofóbico en el extremo N-terminal que dirige al polipéptido naciente al retículo endoplasmático, eliminándose una vez cumplida su función. Las 1,3- β -glucanasas de clase I están representadas por las isoenzimas básicas de tabaco con una masa molecular aproximada de 33 kDa. En esta clase, a la preproteína anteriormente descrita se añade una corta secuencia N-glicosilada en el extremo C-terminal, siendo esta última región la responsable de su transporte a la vacuola. La proteína madura se obtiene una vez que dicha secuencia es eliminada tras su transporte (Van den Bulcke *et al.*, 1989; Sticher *et al.*, 1992; Melchers *et al.*, 1993). Al contrario que las 1,3- β -glucanasas de clase I, las isoenzimas de las clases II, III y IV presentan un carácter ácido, carecen de un péptido señal en el extremo C-terminal y son excretadas al medio extracelular. En este grupo de enzimas apoplásticas, las 1,3- β -glucanasas de clase II son las más habituales, presentando una masa molecular media de 34-36 kDa y difiriendo en, al menos, un 48,8 % en la secuencia aminoacídica con las de clase I (Linthorst *et al.*, 1990; Meins *et al.*, 1992; Beffa *et al.*, 1993; Simmons *et al.*, 1994). La proteína de 35 kDa PR-2d es el único miembro de las 1,3- β -glucanasas de clase III en tabaco, difiriendo en más de un 40 % en su estructura primaria con las de clase I y II (Payne *et al.*, 1990). No obstante, se han aislado varios genes y clones de DNAC en otras especies con un alto grado de homología con las 1,3- β -glucanasas de clase III de tabaco (Domingo *et al.*, 1994; Cheong *et al.*, 2000; Sánchez-Ballesta *et al.*, 2006). Por último, las 1,3- β -glucanasas de clase IV están asociadas a un único ejemplo, la proteína Tag1 expresada específicamente en la antera de las flores del tabaco. Está caracterizada por la presencia de un péptido señal en el extremo N-terminal en su forma inmadura, una masa molecular de 35 kDa y una identidad en la secuencia con el resto de clases que oscila entre el 37 y el 38 % (Bucciaglia y Smith, 1994).

1.4.1.2.- Mecanismo de hidrólisis

Las 1,3- β -glucanasas también pueden clasificarse según el tipo de enlace sobre el que actúan y por su modo de acción. Así existen las exo- β -1,3-glucanasas (EC 3.2.1.58), que hidrolizan los polímeros de β -1,3-glucano desde el extremo no reductor originando monómeros de glucosa, y las endo- β -1,3-glucanasas (EC 3.2.1.39), que rompen enlaces internos dando lugar a oligómeros de dos, tres o más unidades. En este sentido, se requiere la actividad conjunta de ambas clases de enzimas para una degradación completa del sustrato (Pitson *et al.*, 1993).

1.4.2.- Estructura y regulación de los genes de las 1,3- β -glucanasas

Los genes de las 1,3- β -glucanasas se organizan usualmente en familias multigénicas, con una ausencia generalizada de intrones o con la presencia de un único intrón localizado en el extremo N-terminal de la región codificante (Leubner-Metzger y Meins, 1999). En general, las 1,3- β -glucanasas muestran una regulación ligada al desarrollo de la planta y también son inducidas o reprimidas en respuesta al tratamiento con diferentes hormonas o a la infección por patógenos. En el caso de los genes de las 1,3- β -glucanasas de clase I de tabaco, su regulación se produce inicialmente a nivel transcripcional, identificándose varios elementos *cis* que actúan como promotores. Entre los diferentes factores responsables de estas respuestas encontramos al etileno, el SA o la infección por el TMV (Van de Rhee *et al.*, 1993; Vogeli-Lange *et al.*, 1994; Livne *et al.*, 1997). En el caso del elemento responsable del etileno, su actividad inductora y la respuesta ante esta hormona gaseosa dependen de la integridad del anteriormente citado tandem de cajas GCC (Hart *et al.*, 1993). Por otro lado, la acumulación de ARNm y proteína 1,3- β -glucanasa de clase I está fuertemente reprimida ante la presencia de auxina y citoquininas (Vögeli-Lange *et al.*, 1994; Rezzonico *et al.*, 1998).

Los genes de las 1,3- β -glucanasas de clase II y III también muestran múltiples regiones en su secuencia que funcionan como elementos-*cis* reguladores ante la presencia de SA o la infección por el TMV (Côté *et al.*, 1991; Henning *et al.*, 1993; Van de Rhee *et al.*, 1993). Pero al contrario que las de clase I, su inducción es débil o nula tras la aplicación de ethephon (ácido 2-cloroetiloxofosfónico) (Memelink *et al.*, 1990; Brederode *et al.*, 1991; Beffa *et al.*, 1995). No obstante, el efecto de esta hormona en la expresión de genes de 1,3- β -glucanasas de clase III difiere en diferentes especies de plantas. Así, en la bibliografía están descritos varios casos de enzimas cuya inducción se produce tras un tratamiento con etileno (Domingo *et al.*, 1994; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2006).

En general, y de acuerdo a las múltiples rutas de señalización interconectadas de las proteínas PR, se puede concluir con la existencia de: 1) Una vía dependiente de etileno responsable de la inducción de quitinasas y 1,3- β -glucanasas de clase I (Ecker, 1995; Penninckx *et al.*, 1996), 2) una ruta dependiente de SA asociada a la respuesta SAR y que activa la expresión de genes de 1,3- β -glucanasas de clase II y III (Lawton *et al.*, 1994a; Ryals *et al.*, 1996).

1.4.3.- Funcionalidad de las 1,3- β -glucanasas

Una característica general de estas enzimas hidrolíticas es el intervalo tan amplio de potenciales funcionalidades. En el caso de los hongos, las 1,3- β -glucanasas pueden jugar distintos papeles, como la penetración en la pared celular de la célula del huésped, como mecanismo de defensa tanto del patógeno como del hospedador, participación en procesos morfogénicos o en la obtención de energía a partir de polisacáridos de reserva o proporcionados por otros organismos (Albersheim *et al.*, 1969; Griffin, 1994; Yong-ting *et al.*, 2009).

De un modo similar a las quitinasas, la presencia de polímeros de β -1,3-glucano en las paredes celulares de los hongos patógenos de las plantas (Wessels *et al.*, 1981; Nicholas *et al.*, 1994) sumada a su actividad antifúngica *in vitro* son factores que permiten incluir a las enzimas 1,3- β -glucanasa como un elemento más del vasto conjunto de mecanismos de defensa de las plantas superiores frente al ataque de fitopatógenos. En este sentido, varios estudios han reflejado las diferencias de este potencial entre las diferentes clases de esta enzima hidrolítica. Así, las isoenzimas básicas pertenecientes a la clase I se han mostrado usualmente efectivas en la lisis de los extremos de las hifas y en la inhibición del crecimiento de varios hongos. Estos efectos contrastan con la habitual ausencia de actividad antifúngica *in vitro* de las 1,3- β -glucanasas ácidas de clase II y III (Sela-Buurlage *et al.*, 1993; Joosten *et al.*, 1995; Lawrence *et al.*, 1996; Anfoka y Buchenauer, 1997; Kim *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2009). No obstante, hay que tener en cuenta que también se ha descrito la presencia de enzimas 1,3- β -glucanasa ácidas en pepino y patata con un significativo efecto inhibitorio sobre el crecimiento de fitopatógenos (Ji y Kuć, 1996; Tonón *et al.*, 2002; Moustafa *et al.*, 2007). Como se ha citado anteriormente, las enzimas 1,3- β -glucanasas de clase I son particularmente efectivas en su acción sinérgica antifúngica cuando son combinadas con quitinasas de clase I. Sin embargo, las enzimas 1,3- β -glucanasas de clase II también reflejan un efecto similar cuando son combinadas con otras quitinasas o 1,3- β -glucanasas de clase I. Por otro lado, este incremento en la inhibición del crecimiento del hongo también se detecta *in vivo* en la coexpresión de ambas clases de transgenes en plantas (Zhu *et al.*, 1994; Jongedijk *et al.*, 1995; Anand *et al.*, 2003). Por último, las 1,3- β -glucanasas de plantas también pueden actuar de un modo indirecto mediante la liberación de oligosacáridos de las paredes celulares de los patógenos (Fig. 5). Estos compuestos pueden actuar como elicitores, señalizando a la planta la existencia de una infección y estimulando la expresión de un amplio rango de genes asociados a respuestas de defensa (Sharp *et al.*, 1984; Schmidt y Ebel, 1987; Cheong *et al.*, 1991; Ryan y Farmer, 1991; Yoshikawa *et al.*, 1993; Okinaka *et al.*, 1995).

La detección de 1,3- β -glucanasas en tejidos específicos de plantas sanas como son raíces, estilo, anteras y semillas (Felix y Meins, 1986; Shinshi *et al.*, 1987; Castresana *et al.*, 1990; Côté *et al.*, 1991; Garcia-Garcia *et al.*, 1994) o la regulación específica de algunas de ellas a lo largo del desarrollo sin mostrar ninguna inducción por señales de estrés (Ori *et al.*, 1990; Bucciaglia y Smith, 1994), sugieren la implicación de las 1,3- β -glucanasas en procesos normales del crecimiento y desarrollo de la planta. En este sentido, se ha comprobado la funcionalidad de estas enzimas durante la germinación de cereales (Fincher, 1989; Simmons, 1994; Høj y Fincher, 1995), en la microesporogénesis (Steiglitz y Stern, 1973; Steiglitz, 1977; Worrall *et al.*, 1992; Bucciaglia y

Smith, 1994), en la formación de las flores (Neale *et al.*, 1990) o en otras etapas del proceso de fertilización de la planta (Lotan *et al.*, 1989; Ori *et al.*, 1990). En este sentido, diversos estudios han constatado que las enzimas 1,3- β -glucanasas pueden adoptar otras funcionalidades biológicas durante la maduración plena (*ripening*) del fruto sin perder sus propiedades hidrolíticas. Así, en pulpa de plátano se puso de manifiesto la importancia de una abundante enzima 1,3- β -glucanasa en el proceso de ablandamiento del fruto durante su maduración (Peumans *et al.*, 2000). Igualmente, resulta interesante resaltar la fuerte correlación del perfil de expresión de este gen con el patrón de actividad 1,3- β -glucanasa y el ablandamiento de la pulpa del fruto en tres cultivares diferentes de plátano (Roy Choudhury *et al.*, 2009). Asimismo, se ha observado un aumento significativo en el nivel de expresión de dos genes de 1,3- β -glucanasa en frutos de fresa a lo largo de esta etapa del desarrollo (Shi *et al.*, 2006). Por otro lado, y al igual que el comportamiento observado para las quitinasas de clase I, varios estudios han señalado a las 1,3- β -glucanasas como potenciales alérgenos del síndrome látex-fruta en base la coincidencia de alguno de los epítomos del alérgeno de látex Hev b 2 con los observados en 1,3- β -glucanasas procedentes de frutos o polen (Palomares *et al.*, 2005; Receveur-Bréchet *et al.*, 2006; Barre *et al.*, 2009)

Por último, la expresión de 1,3- β -glucanasas también se incrementa en respuesta a otros tipos de estrés abiótico como el daño mecánico, las elevadas o bajas temperaturas y la exposición al ozono o la radiación UV (Brederode *et al.*, 1991; Schraudner *et al.*, 1992; Hon *et al.*, 1994; Thalmair *et al.*, 1996; Hinch *et al.*, 1997; Ding *et al.*, 2002; Porat *et al.*, 2002a; Pihakaski-Maunsbach *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 2006; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2006; Ballester *et al.*, 2010). Estas situaciones han sugerido que las enzimas 1,3- β -glucanasas podrían tener otra función o funciones diferentes a las ligadas a la reacción de defensa o a procesos del desarrollo de la planta. En este sentido, en el apartado 2.5 de la *Introducción* de esta memoria de investigación se detalla con profundidad los papeles suplementarios que pueden jugar algunas quitinasas y 1,3- β -glucanasas en plantas durante el estrés por frío.

2.- Respuestas y mecanismos de defensa de las plantas ante el estrés por frío

Además de las características endógenas de cada especie de planta, los estreses de origen medioambiental representan los factores más limitantes para la productividad de la agricultura. Sin embargo, aunque se trata de un termino ampliamente extendido en fisiología y bioquímica vegetal, el termino ‘estrés’ no tiene una definición sencilla. En este sentido, muchas de las aproximaciones utilizadas son imprecisas o presentan una elevada carga de subjetividad. Así, la definición en un contexto físico posee un significado equivalente a la presión e implica *una fuerza mecánica por unidad de área aplicada sobre un objeto*. Sin embargo, puesto que es difícil cuantificar la fuerza exacta ejercida sobre una planta por un determinado estrés, este término ha sido definido en un marco biológico como *una condición o fuerza adversa que inhibe el funcionamiento normal y el bienestar de un organismo vivo como las plantas* (Jones y Jones, 1989). No obstante, a menudo es difícil distinguir entre aquellas respuestas que repercuten negativamente en la planta y aquellas que poseen un efecto beneficioso. Incluso, algunos factores pueden presentar ambos efectos simultáneamente (Nilsen y Orcutt, 1996). En este sentido, Lichtenthaler (1996) diferencia el concepto de estrés (*estado de la planta cuando se le somete a una fuerza*) del de daño (*resultado de un estrés de tal intensidad que no puede ser compensado por la planta*). Por tanto, es conveniente destacar que, aunque el estrés y sus respuestas vinculadas puedan estar presentes, no siempre esto implica la existencia de un daño, aún cuando la planta está sujeta a periodos largos o incluso a un estrés continuo.

A la hora de entender el efecto del frío sobre las plantas, conviene distinguir entre aquellas temperaturas que se encuentran por encima de 0 °C (*chilling stress*) y por debajo de 0 °C (*freezing stress*). Puesto que el término ‘estrés por bajas temperaturas’ puede resultar arbitrario, en adelante se utilizará este concepto para designar al *chilling stress*. Asimismo, puesto que la temperatura no es una propiedad extensiva relacionada con la cantidad de materia, sino una propiedad intensiva, es más acertado utilizar el concepto de estrés por frío en el marco del binomio tiempo-temperatura (Raison, 1974; Wang, 1990a). Por otro lado, aunque cada especie de planta tiene unos requerimientos termales característicos para alcanzar un desarrollo óptimo, las plantas pueden ser divididas en tres grupos en función de su sensibilidad al frío:

- **Plantas sensibles a las bajas temperaturas (*chilling-sensitive*):** Especies que presentan síntomas de daño tras tiempos prolongados de exposición a temperaturas por debajo de 2-15 °C. Se entiende por plantas moderadamente sensibles aquellas que se alteran en el intervalo entre 2 y 7 °C, y muy sensibles cuando no soportan temperaturas por debajo de 15 °C.
- **Plantas resistentes a las bajas temperaturas (*chilling-resistant*):** Son capaces de tolerar bajas temperaturas por encima de 0 °C pero son seriamente dañadas cuando comienza a formarse hielo en su interior.
- **Plantas resistentes a las heladas (*frost-resistant*):** Especies capaces de soportar temperaturas por debajo de 0 °C.

2.1.- Percepción y transducción de la señal de frío

Puesto que la fluidez de las membranas celulares se encuentra directamente afectada por los cambios en la temperatura, Murata y Los (1997) señalaron esta modificación física como la señal primaria de la percepción del frío. En este sentido, estudios posteriores han descrito como la rigidificación inducida por el estrés por frío en algunos microdominios de la membrana plasmática de alfalfa y colza implica una inducción de genes COR (*cold regulated*) que tiene como consecuencia un proceso de aclimatación al frío (Örvar *et al.*, 2000, Sangwan *et al.*, 2001). Así, una redistribución de la actina del citoesqueleto induce la activación de los canales de calcio (Ca^{+2}) mecanosensibles de la membrana, incrementando la concentración de Ca^{+2} citosólico. Subsecuentemente se observa una amplificación tanto de esta señal a través de la activación de diferentes cascadas de quinasas (CDPK y MAPK) (Vergnolle *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005; Komatsu *et al.*, 2007). Por otro lado, esta activación ha sido demostrada también en un estudio con mutantes de *A. thaliana* (Vaultier *et al.*, 2006). En resumen, todos estos resultados apoyan la idea de que las células de las plantas sienten el estrés por frío a través de la rigidificación de sus membranas.

No obstante, recientemente se ha publicado un interesante trabajo en el cual se ha establecido que los nucleosomas de *A. thaliana* que contienen la histona alternativa H2A.Z actúan como sensores de temperatura. Esta información es utilizada para coordinar el transcriptoma de la planta, indicando la existencia de un mecanismo directo para la percepción de la temperatura (Kumar y Wigge, 2010). Aunque este trabajo se ha centrado en un rango de temperaturas templado (12-27 °C), sus resultados abren las puertas a la existencia de nuevos mecanismos que expliquen la percepción del frío.

Las plantas poseen moléculas que actúan como señales secundarias en la transmisión de la señal de frío. Así, y como ha sido demostrado en un estudio de mutantes de *A. thaliana* hipersensibles a la congelación (Xiong *et al.*, 2001), el ABA puede transmitir señales del estrés por frío a través de mensajeros secundarios como el Ca^{+2} y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Asimismo, es un hecho conocido que los ROS se acumulan en células expuestas al estrés por frío y que estas especies reactivas parecen tener una fuerte influencia sobre la regulación de la expresión génica por el efecto de las bajas temperaturas (Lee *et al.*, 2002; Teige *et al.*, 2004). Por último, se ha descrito que la acumulación de ciertos metabolitos como la prolina podría inducir la expresión de muchos genes gracias a la presencia de un promotor sensible a este osmoprotector (Sato *et al.*, 2002; Oono *et al.*, 2003).

Por otro lado, debido a la multiplicidad de agresiones medioambientales a las que una planta tiene que hacer frente a lo largo de su ciclo vital, la señalización de los diferentes tipos de estrés biótico y abiótico se torna un fenómeno sumamente complejo. Por ello, las plantas han desarrollado mecanismos que les permiten incrementar su tolerancia a través de adaptaciones físicas y mediante cambios interactivos a nivel molecular y celular. En este sentido, por un lado, son capaces de producir respuestas inducibles que provocan un cambio específico para un tipo de estrés en particular (Knight y Knight, 2001). Sin embargo, por otro lado, también existe un

importante entrecruzamiento entre las rutas de señalización en respuesta a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico. Así, diferentes hormonas vegetales endógenas como SA, JA, etileno y ABA regulan primordialmente las respuestas protectoras de plantas mediante acciones sinérgicas y antagónicas (Lorenzo y Solano, 2005; Mauch-Mani y Mauch, 2005). En este sentido, Anderson *et al.* (2004) han demostrado en *A. thaliana* que la ruta de señalización del ABA por un lado y las rutas del JA y etileno por otro son mutuamente incompatibles, modulando la expresión de genes de defensa y sensibles al estrés en respuesta a distintos tipos de estrés biótico y abiótico. Por otra parte, se ha descrito como plantas de esta misma especie han obtenido tolerancia a la congelación tras la aplicación de ABA o en respuesta al estrés hídrico (Mäntylä *et al.*, 1995). En este sentido, dado que la exposición a bajas temperaturas origina una deshidratación en la planta, resulta lógico que muchos genes inducidos por el frío sean también inducidos por ABA o por el estrés hídrico (Shinozaki *et al.*, 2000). Asimismo, otros estudios han identificado otras moléculas relevantes comunes a diferentes rutas de señalización de respuestas al estrés. Por ejemplo, el NO y el Ca^{+2} juegan un importante papel en las respuestas de defensa de las plantas o en las respuestas frente a la sequía (Wendehenne *et al.*, 2004; Mauch-Mani y Mauch, 2005). En este sentido, el aumento de la concentración de Ca^{+2} citosólico y la activación de las cascadas MAPK también representan importantes nodos en el entrecruzamiento de las diferentes rutas de señalización en la respuesta de varios tipos de estrés biótico y abiótico (Jonak *et al.*, 2002; Nakagami *et al.*, 2005). Por último, la producción de ROS, y muy especialmente del H_2O_2 , ha sido propuesta como un proceso clave en la respuesta de las plantas a los estreses bióticos y abióticos (Torres y Dangl, 2005; Miller *et al.*, 2008).

2.2.- Regulación de la expresión génica durante el estrés por frío

Un ejemplo de los profundos cambios inducidos en el transcriptoma de la planta por efecto de la exposición a las bajas temperaturas puede observarse en los estudios realizados con *A. thaliana*, donde estiman que los genes regulados por frío constituyen entre un 4 y un 20 % del genoma (Lee *et al.*, 2005; Hannah *et al.*, 2005). Dada la complejidad de esta regulación de la expresión génica, y puesto que el objetivo de este apartado es únicamente el de establecer una síntesis de las características del proceso, se pueden consultar alguna de las excelentes revisiones recientes sobre el tema si se desea ampliar información (Chinnusamy *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007; Ruelland *et al.*, 2009; Chinnusamy *et al.*, 2010).

El estrés por frío regula el transcriptoma de la planta a través de mecanismos transcripcionales, postranscripcionales y postraduccionales. En este sentido, la ruta mejor estudiada y caracterizada es la cascada transcripcional ICE1-CBF (*inducer of CBF expression 1; C-repeat binding factor*), la cual tiene un importante papel durante la aclimatación al frío de numerosas especies de plantas (Fig. 6). Así, una vez que se ha percibido el frío y su señal ha llegado al núcleo, se induce la expresión de los genes *CBF 1-3* y sus productos correspondientes se unen al elemento *cis* CRT/DRE de los genes *COR*, activándolos transcripcionalmente. En este sentido, estos genes se disponen en una superfamilia que codifica proteínas implicadas en el

aumento de la resistencia de las plantas contra los efectos del frío (Thomashow, 1999). Por otro lado, puesto que los genes *CBF* son activados por el frío, hay un factor de transcripción ya presente a temperaturas normales de crecimiento (*ICE1*) que activa la expresión del gen *CBF3*. Los niveles de la proteína *ICE1* y su actividad se encuentran regulados negativamente por ubiquitinación y activados por fosforilación y sumoilación. Asimismo, la expresión de los genes *CBF* esta regulada negativamente por los factores de transcripción *ZAT12* y *MYB15*, el cual a su vez es reprimido por la acción de *ICE1*, reflejando el entrecruzamiento existente. Por otro lado, los *CBF* inducen la expresión de *ZAT10*, cuyo producto reprime la expresión de genes *COR*. En este sentido, se ha sugerido que los anteriormente citados factores de transcripción *ZAT10* y *ZAT12* pueden actuar como reguladores del sistema de degradación de ROS, funcionando como nodos convergentes en las redes de transcripción de los diferentes tipos de estrés (Davletova *et al.*, 2005; Mittler *et al.*, 2006). Por último, además de la regulación transcripcional, recientemente se han detectado diferentes mecanismos postranscripcionales durante la aclimatación al frío de *A. thaliana*. En este sentido, diferentes secuencias de ARN interferente han reflejado su papel regulador sobre procesos como el corte y empalme del pre-ARNm, la exportación del ARNm desde el núcleo o su degradación (Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Shukla *et al.*, 2008).

2.3.- Respuestas estructurales y bioquímicas asociadas al estrés por frío

Los cambios ultraestructurales asociados al estrés por bajas temperaturas implican un hinchamiento de los cloroplastos y las mitocondrias, una deformación de los tilacoides, una reducción en el tamaño y número de granos de almidón, y la formación de pequeñas vesículas en la membrana de los cloroplastos (Kratsch y Wise, 2000). Por otro lado, el descenso de la temperatura tiene un efecto general sobre la cinética del metabolismo de la planta, alterando su regulación. En este sentido, la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente se encuentra definida principalmente por dos factores: el número de copias activas de la enzima y el equilibrio químico dependiente de la temperatura. En ambos casos, las velocidades de los procesos biológicos cambian exponencialmente con la temperatura (Johnson *et al.*, 1974). Asimismo, la exposición a las bajas temperaturas implica un aumento de la probabilidad de que las cadenas laterales apolares de las proteínas entren en contacto con las moléculas de agua del medio, afectando a la estabilidad y solubilidad de muchas proteínas globulares y provocando una desnaturalización (*cold denaturation*) en última instancia (Privalov, 1990; Siddiqui y Caviocchioli, 2006). Por otro lado, la mencionada acumulación de ROS por el estrés por frío deriva en la aparición de un estrés oxidativo característico. El estrés oxidativo se origina cuando la homeostasis de la célula sufre un desequilibrio, provocando una acumulación desproporcionada de ROS. En este caso, este incremento está originado tanto en un descenso de la capacidad compensatoria del sistema antioxidante de la planta (Prasad *et al.*, 1994a; Tjus *et al.*, 2001) como en la fotoinhibición de los cloroplastos (Ensminger *et al.*, 2006). Por otro lado, estas moléculas tóxicas, correspondientes a formas parcialmente reducidas del O₂, pueden dar lugar a una serie de efectos dañinos al reaccionar rápidamente con lípidos, proteínas o ADN, ocasionando en última

instancia la muerte celular (Scandalios, 1993; Havaux y Niyogi, 1999; Nakano *et al.*, 2006; Kaniuga, 2008).

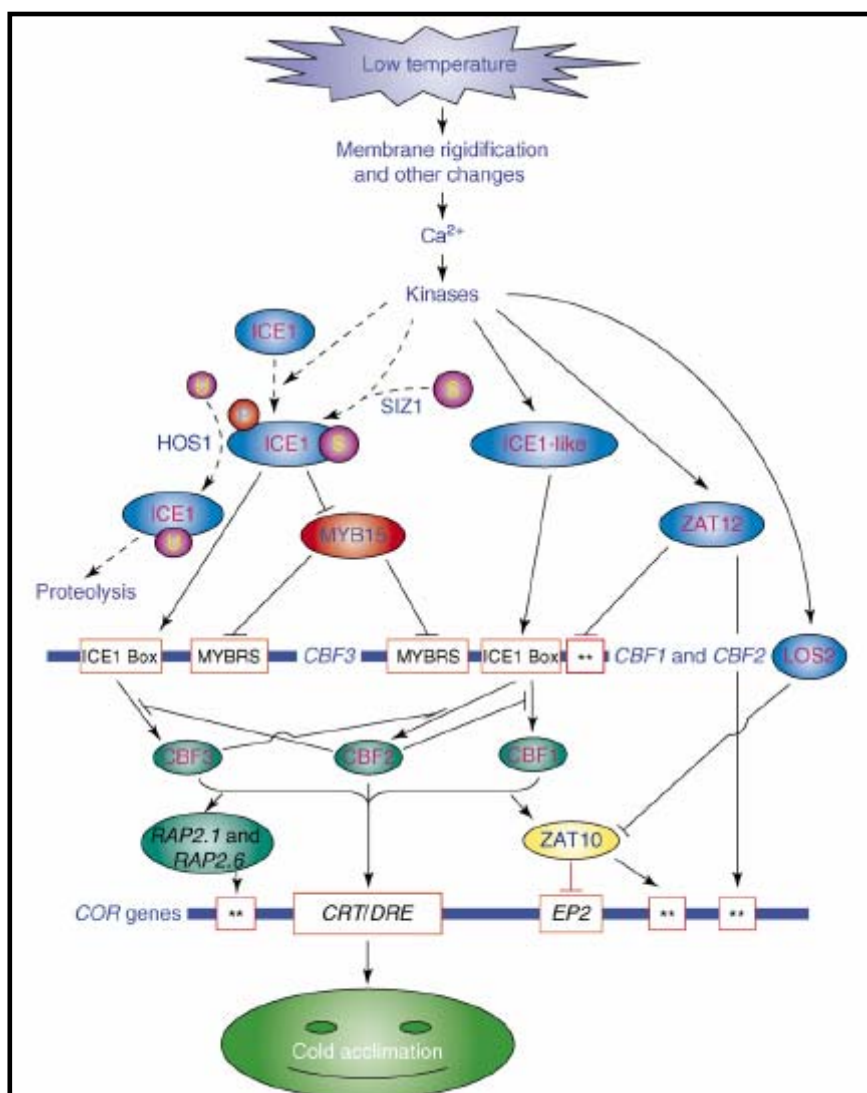


Figura 6. Diagrama de la red de regulación transcripcional sensible al frío en *A. thaliana* (Chinnusamy *et al.*, 2007). Las flechas con trazo discontinuo indican una regulación postranscripcional; las flechas con trazo continuo reflejan una activación, mientras que las líneas que finalizan en un segmento perpendicular muestran una regulación negativa; las dos estrellas (*) indican elementos *cis* desconocidos. CBF (*C-repeat binding factor*); CRT (*C-repeat elements*); DRE (*dehydration-responsive elements*); ICE1 (*inducer of CBF expression 1*); MYB (*myeloblastosis*); P (*phosphorylation*); S (*sumoylation*); U (*ubiquitin*).

La exposición a temperaturas por debajo de 0 °C tiene efectos mucho más dañinos sobre la estructura celular de la planta. En este sentido, además de magnificar los procesos anteriores, gran parte de los daños causados se deben a la fuerte deshidratación celular y a la contracción osmótica inducida por la congelación del fluido extracelular. El origen de este fenómeno se debe a la menor temperatura de congelación del fluido extracelular con respecto a la del citoplasma debido a su baja concentración de solutos. Puesto que el potencial químico del hielo es menor que el del agua líquida, los cristales de hielo extracelulares crecerán a costa del agua de la célula hasta que los potenciales del agua y el hielo se igualen. Además, como el potencial químico del agua es directamente proporcional a la temperatura, la deshidratación celular aumentará

progresivamente al bajar la temperatura (Olien y Smith, 1977). Por otro lado, este proceso de deshidratación también puede causar varios tipos de daños directos sobre las membranas celulares. Así, la potencial descongelación posterior del hielo extracelular causaría un fenómeno de expansión osmótica que puede derivar en la lisis de los protoplastos (Uemura *et al.*, 2006). Igualmente, la contracción celular puede inducir una aposición de las membranas plasmáticas y de las membranas de los cloroplastos. La generación del consiguiente intermedio micelar invertido puede generar lesiones en forma de fracturas o transiciones de fase de los lípidos (lamelar a hexagonal II) que impliquen la pérdida de la estructura de bicapa lipídica (Siegel, 1987; Uemura *et al.*, 1995). En este sentido, la función primaria de la aclimatación al frío es la de estabilizar las membranas contra el daño provocado por esta congelación. Este mecanismo natural, asociado a la tolerancia a la congelación, se encuentra presente en un gran número de plantas originarias de zonas templadas y boreales (Gilmour *et al.*, 1988; Webb *et al.*, 1994). Así, durante este proceso se produce una reestructuración física y bioquímica de las membranas celulares a través de cambios en su composición lipídica (Palta *et al.*, 1993; Campos *et al.*, 2003; Ivanov *et al.*, 2006) y del aumento en la insaturación de los fosfolípidos (Uemura *et al.*, 1995; Vijayan y Browse, 2002). El principal papel jugado por ambos procesos es la prevención de la lisis inducida por la expansión osmótica y la formación de la fase hexagonal II (Uemura y Steponkus, 1989; Uemura y Steponkus, 1997). Por otro lado, se ha observado como la rigidificación de las membranas se encuentra ligada a una alteración de todos los procesos asociados a esta barrera (Murata y Los, 1997; Örvar *et al.*, 2000; Sangwan *et al.*, 2001). Por todo ello, el incremento en la proporción de ácidos grasos insaturados también está asociado a un aumento de la fluidez de la membrana plasmática, contrarrestando dicha rigidificación (Tasseva *et al.*, 2004). La aclimatación al frío también está acompañada por cambios en la pared celular, destacando entre ellos: cambios en su composición péctica (Solecka *et al.*, 2008), un incremento en su espesor (Huner *et al.*, 1981), una minimización de la entrada de hielo extracelular (Rajashekar y Burke, 1996) o un aumento de su rigidez evitando la deformación celular por la deshidratación (Rajashekar y Lafta, 1996).

Por otro lado, la acumulación de azúcares solubles durante la aclimatación al frío se trata de un fenómeno bien conocido, correlacionándose de un modo fiel el perfil de acumulación de estos compuestos con el desarrollo de la tolerancia a la congelación (Wanner y Junttila 1999; Gusta *et al.*, 2004; Kamata y Uemura, 2004; Kaplan *et al.*, 2004). En este sentido, existen suficientes evidencias genéticas que apoyan el papel de los azúcares solubles en este proceso. Por ejemplo, un mutante de *A. thaliana* (*sfr4*) incapaz de aclimatarsse al frío no acumula azúcares en respuesta a las bajas temperaturas (McKown *et al.*, 1996). Asimismo, plantas transgénicas de esta misma especie que sobreexpresan enzimas de las rutas de síntesis de azúcares han mostrado un significativo incremento de la tolerancia a la congelación (Liu *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2007). Se han sugerido varios mecanismos que explican el efecto protector de los azúcares solubles sobre los daños asociados a la congelación. Un importante aspecto asociado a estos solutos es su papel jugado en el ajuste osmótico de la célula. La acumulación de carbohidratos cambia el potencial osmótico celular y disminuye consecuentemente la diferencia de potencial químico entre el agua líquida y el hielo extracelular, frenando en consecuencia la deshidratación (Steponkus, 1984;

Gusta *et al.*, 2004). Otra función de la acumulación de azúcares sería la de evitar la nucleación del hielo mediante un descenso de la temperatura de congelación del agua por un efecto coligativo (Reyes-Díaz *et al.*, 2006). Asimismo, otras funciones de estos solutos durante la aclimatación al frío se dirigen a la estabilización de la membrana plasmática durante la deshidratación (Crowe *et al.*, 1990), a sus capacidades crioprotectoras sobre enzimas lábiles a las bajas temperaturas (Carpenter y Crowe, 1988) o a las propiedades antioxidantes frente a las ROS acumuladas (Bogdanović *et al.*, 2008). Por último, los azúcares pueden dar lugar a una fase vítrea con el hielo formado, disminuyendo la reactividad química del entorno y estabilizando la célula (Bruni y Leopold, 1992).

Además de los azúcares solubles, las plantas pueden acumular otros compuestos que pueden incrementar el potencial osmótico de la célula y prevenir la deshidratación inducida por la congelación. Se denominan solutos compatibles u osmolitos y consisten en un heterogéneo grupo de moléculas orgánicas de baja masa molecular que pueden acumularse a elevadas concentraciones sin afectar al metabolismo celular. Entre ellos nos encontramos con algunos aminoácidos como prolina o metilaminas como la glicina betaína (Yancey, 2005). Si nos centramos en el papel de la prolina, se han obtenido fuertes evidencias genéticas sobre su papel en el aumento de la tolerancia a la congelación en *Arabidopsis* (Xin y Browse, 1998) y trigo (Kamata y Uemura, 2004). El mecanismo protector de la prolina no se encuentra determinado exactamente, puesto que además de su papel como osmolito, este compuesto puede contribuir a la estabilización de membranas y proteínas, la neutralización de ROS, la regulación de la acidosis citoplasmática o servir como una fuente de ATP (Hare y Cress, 1997; Szabados y Savouré, 2010). Por otro lado, la glicina betaína es un compuesto de amonio cuaternario sintetizado únicamente en el cloroplasto de algunas especies de plantas (Wyn Jones y Storey, 1981). Así, en acumuladores naturales de glicina betaína como el trigo y la cebada se ha observado una clara correlación entre el incremento de la concentración de este compuesto y la resistencia a la congelación (Koster y Lynch, 1992; Kamata y Uemura, 2004). Si tenemos en cuenta su elevada capacidad crioprotectora *in vitro* frente a complejos proteicos, membranas celulares y liposomas (Lloyd *et al.*, 1994; Papageorgiou y Murata, 1995; Popova y Busheva, 1997; Chen *et al.*, 2000) o su papel como chaperonas químicas (Bourot *et al.*, 2000; Diamant *et al.*, 2001), la glicina betaína muestra un mecanismo dual de protección frente a la congelación: como osmolito y como estabilizador de membranas y complejos proteicos. En este sentido, el modelo osmofóbico explica el aumento de la estabilidad de proteínas en presencia de glicina betaína por su fuerte exclusión del esqueleto peptídico (Bolen y Baskakov, 2001).

Una de las respuestas mejor estudiadas en las plantas durante el estrés por frío es la acumulación de proteínas altamente hidrofílicas que presentan una estructura secundaria en forma de hélice α anfipática, siendo codificadas mayoritariamente por los genes *COR* (Thomashow, 1999). Entre ellas, el grupo más importante y mejor caracterizado está formado por la dehidrinas. Las dehidrinas están encuadradas dentro del grupo II de las proteínas LEA y están caracterizadas por la presencia de tres dominios altamente conservados (Close, 1996; Close, 1997). En este sentido, la acumulación de una dehidrina en trigo (Danyluk *et al.*, 1998) o la

sobreexpresión de múltiples dehidrinas en *A. thaliana* (Puhakainen *et al.*, 2004) se ha correlacionado con su capacidad para tolerar la congelación. No obstante, aunque actualmente se desconoce el modo exacto con el que estas proteínas interfieren en el proceso de congelación, su localización en zonas cercanas a la membrana plasmática sugiere un papel como agentes estabilizadores de esta barrera durante la deshidratación. En este sentido, la presencia de hélices anfipáticas en su estructura apunta a que las dehidrinas pueden situarse entre las membranas y el citosol (Koag *et al.*, 2003). No obstante, las dehidrinas no son las únicas proteínas hidrófilas acumuladas durante el estrés por frío. Por ejemplo, la inducción de la proteína COR15a en *Arabidopsis* está asociada con el aumento *in vivo* de la tolerancia a la congelación de los cloroplastos (Artus *et al.*, 1996) y evita la transición a fase hexagonal II de las membranas plasmáticas (Steponkus *et al.*, 1998).

En los tejidos de las plantas, la formación de hielo intercelular es letal para la célula ya que la membrana plasmática sufre rupturas irreversibles, provocando su desestabilización y la pérdida de sus características de semipermeabilidad (Steponkus, 1984). En este sentido, las plantas tolerantes a la congelación han desarrollado un mecanismo sumamente eficaz durante la aclimatación al frío para evitar la presencia de esta clase de hielo. Así, estos organismos, al igual que determinados peces e insectos, pueden acumular proteínas anticongelantes o AFPs (*antifreezing proteins*). Las AFPs son secretadas al medio extracelular y son capaces de unirse de un modo irreversible a la superficie del hielo, incorporándose a su retículo cristalino. Este fenómeno implica la inhibición y modificación del crecimiento de cristales de hielo en el espacio intercelular de la planta (Atici y Nalbantoglu, 2003). Actualmente se desconocen cuales son los determinantes moleculares que permiten a las AFPs inhibir el crecimiento de los cristales de hielo. Sin embargo está demostrada la existencia en las AFPs tanto de residuos capaces de unirse al hielo mediante la formación de puentes de hidrogeno como de grupos hidrofóbicos que contribuyen a esta unión (Sonnichsen *et al.*, 1996; Ewart *et al.*, 1999). Por otro lado, dentro de las AFPs de plantas no existe una secuencia consenso ni se ha logrado identificar una estructura como un dominio de unión a hielo. Por ejemplo, mientras una AFP procedente de *Lolium perenne* presenta un plegamiento predicho en forma de rollo β (Sidebottom *et al.*, 2000), una AFP de zanahoria está compuesta principalmente por repeticiones ricas en Leu (Zhang *et al.*, 2004b). Asimismo, mientras una proteína con una gran similitud con una dehidrina mostró una leve actividad anticongelante (Wisniewski *et al.*, 1999), la mayoría de AFPs observadas en plantas manifiestan secuencias similares a determinadas proteínas PR (Griffith y Yaish, 2004).

2.4.- El daño por frío

2.4.1.- Definición y características del daño por frío

La conservación a bajas temperaturas se considera uno de los métodos más efectivos en el mantenimiento de la calidad de los frutos y hortalizas, siendo ampliamente utilizado en la incremento de su vida comercial útil. Su utilización implica una reducción de la tasa respiratoria de los frutos, una menor deshidratación, un descenso en la incidencia del ataque de fitopatógenos

y un retraso en la aparición de la senescencia. Sin embargo, puesto que la mayor parte de frutos y hortalizas pertenecen a especies sensibles a las bajas temperaturas, su exposición a temperaturas bajas por encima del punto de congelación durante periodos de tiempo variables puede derivar en una disfunción fisiológica y organoléptica denominada comúnmente daño por frío (Lyons, 1973; Jackman *et al.*, 1988; Parkin *et al.*, 1989; Marangoni *et al.*, 1996). El umbral de temperatura por debajo del cual se desarrollan esta alteración depende de cada especie y variedad, pero suele estar comprendida entre 8 y 15 °C para especies tropicales y subtropicales, oscilando entre 4 y 7 °C para especies procedentes de climas templados (Bramlage y Meir, 1990; Paull, 1990; Lurie, 2009). Por otro lado, la susceptibilidad al desarrollo del daño por frío está condicionada tanto por determinantes intrínsecos del fruto (especie, variedad, tipo de tejido, estado de desarrollo, condiciones pre-recolección) como por factores extrínsecos asociado a las condiciones de conservación (binomio tiempo-temperatura, humedad relativa, composición de la atmósfera, tratamientos post-recolección). En este sentido, es importante remarcar que las especies climatéricas son más proclives a sufrir el daño por frío cuando presentan un metabolismo muy activo. Asimismo, se ha observado que los frutos inmaduros son más sensibles al frío que los maduros de un mismo periodo de recolección (Saltveit y Morris, 1990; Ferguson *et al.*, 1999).

La respuesta de los tejidos de las plantas sensibles al daño por frío se separa habitualmente en respuestas primarias y secundarias (Fig. 7). Tras la aparición de esa lesión inicial inducida por las bajas temperaturas o evento primario, se desarrollan un gran número de desordenes metabólicos y estructurales que darán lugar, primero, a una serie de síntomas fisiológicos. A continuación se originarán un conjunto de síntomas visibles (Fig. 8). Por último, y siempre que los tejidos sean expuestos a temperaturas de daño durante un prolongado periodo de tiempo, se producirá la muerte celular. En este sentido, aunque los síntomas visibles con los que se manifiesta el daño por frío son muy diversos, podemos clasificarlos en dos categorías. Por un lado, se observan un conjunto de anomalías cualitativas del desarrollo y del metabolismo como una maduración incompleta o el desarrollo de un insuficiente sabor y aroma. Por otro lado, se pueden producir también síntomas como el picado de la piel (*pitting*), pardeamientos internos o superficiales, la exudación y posterior deshidratación del tejido, el oscurecimiento de la pulpa, la descomposición de tejidos o el debilitamiento de la resistencia frente a daños mecánicos y el ataque de patógenos (Jackman *et al.*, 1988; Hardenburg *et al.*, 1990; Paull, 1990; Saltveit y Morris, 1990; Sevillano *et al.*, 2009).

Aunque a continuación se van a especificar los cambios fisiológicos y bioquímicos particulares asociados al daño por frío, en líneas generales se establece que su desarrollo se puede separar en dos fases sucesivas de acuerdo al binomio tiempo-temperatura (Fig. 7). La primera, denominada fase de latencia o reversible, se prolonga en un periodo de tiempo que puede variar entre horas y semanas, caracterizándose por la presencia de alteraciones poco severas que no se manifiestan en forma de síntomas visibles. Una de las propiedades del daño por frío es que el proceso global es completamente reversible durante esta fase inicial si se expone el fruto a una temperatura superior a la de daño. La segunda fase tiene lugar cuando aparecen los síntomas visibles del daño por frío, considerándose que la disfunción ya es irreversible y en donde la

aplicación de un leve calentamiento solo contribuye a acelerar los procesos degradativos (Raison, 1974; Raison y Orr, 1990).

En el caso concreto de la chirimoya (*Annona cherimola*), su rápido proceso de maduración climatérica hace necesaria la utilización de la conservación refrigerada para evitar las importantes pérdidas comerciales asociadas a la senescencia del fruto. Sin embargo, este fruto de origen subtropical también se encuentra caracterizado por una elevada sensibilidad a las bajas temperaturas, siendo muy susceptible al desarrollo del daño por frío. En este sentido, varias investigaciones sobre chirimoya han establecido la temperatura umbral para la aparición de este desorden fisiológico en un rango de temperaturas que oscila entre 8 y 10 ° C (Gutiérrez *et al.*, 1992; Alique *et al.*, 1994; Gutiérrez *et al.*, 1994). En todo caso, aunque en estas condiciones el fruto se puede conservar durante un periodo aproximado de dos semanas, es necesario transferirlo a temperatura ambiente para su maduración plena. Por otro lado, y al igual que en otros frutos, la aparición de los síntomas de daño por frío en chirimoya es más habitual una vez que han sido trasladados de nuevo a temperatura normal de maduración. Así, como puede verse en la Figura 8, los síntomas visibles más frecuentes son la aparición de zonas pardeadas o de *pitting* en la piel del fruto, la pérdida de color de la pulpa, un proceso de maduración incorrecto o la aparición de vesículas rosadas alrededor de las semillas (Palma *et al.*, 1993). De acuerdo al establecimiento de dos fases en el desarrollo del daño por frío (Fig. 7), estudios previos han establecido el periodo que transita entre 5 y 9 días de conservación a 6 °C como la frontera de reversibilidad para chirimoyas de la variedad ‘Fino de Jete’ (Alique *et al.*, 1994; Alique y Zamorano, 2000; Muñoz, 2000).

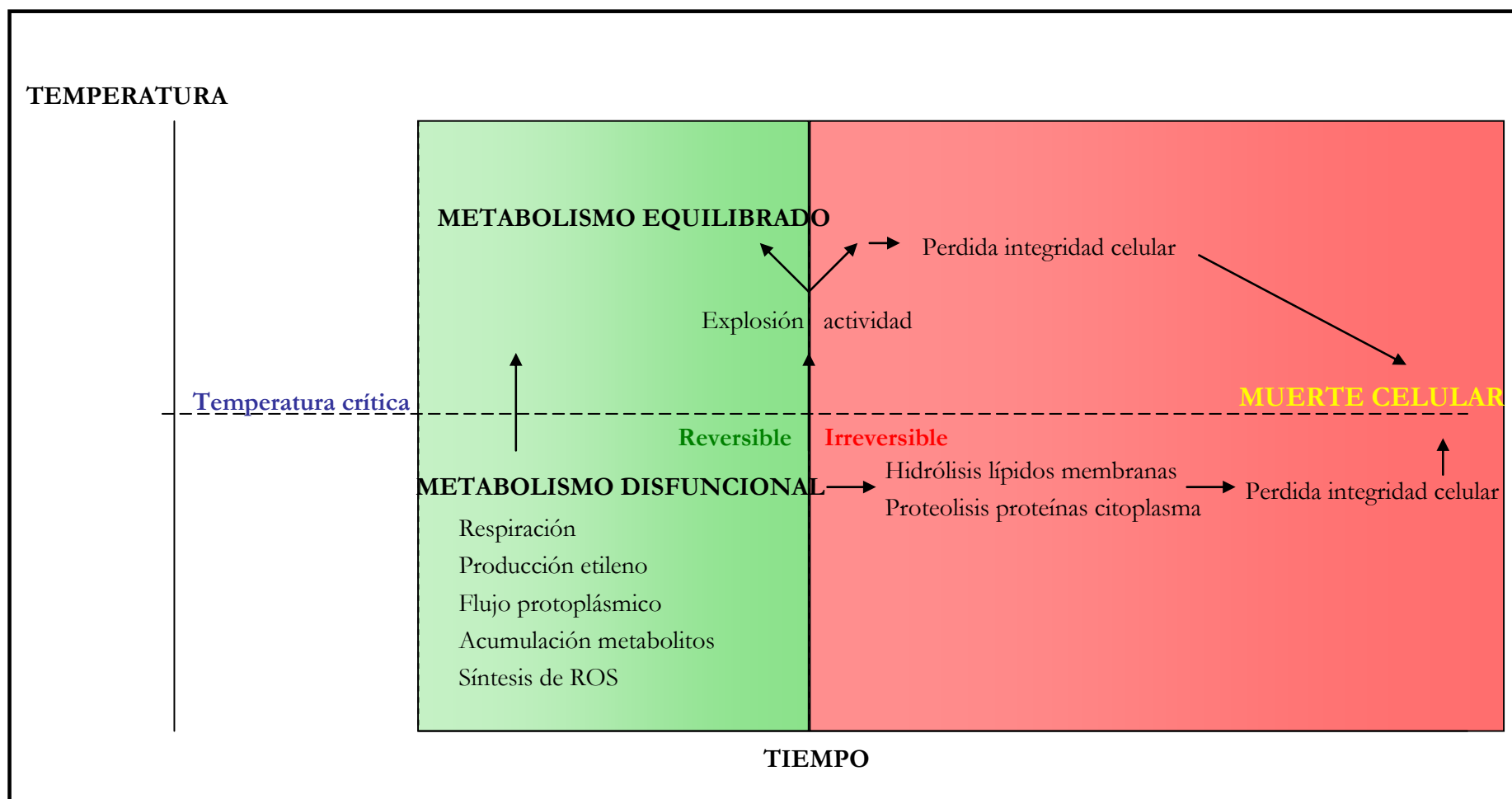


Figura 7. Modelo esquemático de la relación existente entre respuestas primarias y secundarias del daño por frío (Raison y Orr, 1990).

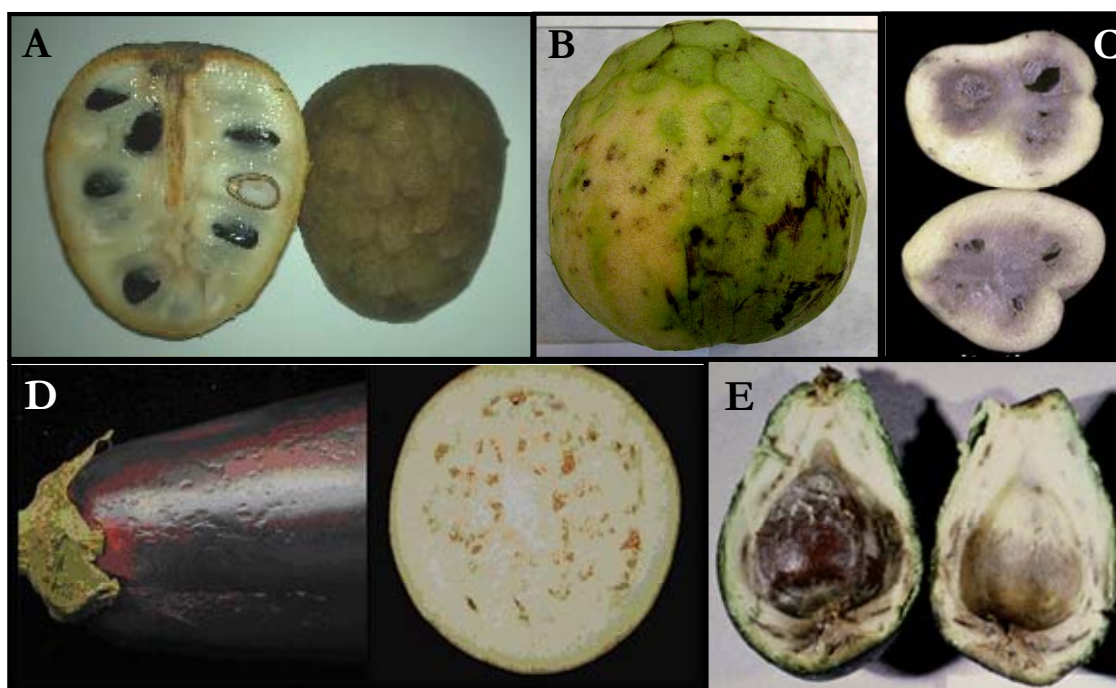


Figura 8. Síntomas visibles del daño por frío en frutos y hortalizas sensibles a las bajas temperaturas. (A) Chirimoya con pardeamientos en la piel, pérdida de color de la pulpa y presencia de exudados. (B) Chirimoya con signos de *pitting* en la piel. (C) Patata con pardeamiento interno y descomposición de tejidos. (D) Berenjena con síntomas de *pitting* en la piel y oscurecimiento de la pulpa y las semillas. (E) Aguacate con pardeamiento interno y descomposición de la pulpa.

2.4.2.- Cambios fisiológicos y bioquímicos del daño por frío

A lo largo de estos últimos años se han determinado gran número de las rutas moleculares y metabólicas implicadas en la percepción y transducción de la señal de frío en plantas resistentes a las bajas temperaturas como *A. thaliana* o *B. napus*. No obstante, aunque se ha observado la presencia de mecanismos conservados a nivel molecular entre *A. thaliana* y especies sensibles a las bajas temperaturas como arroz y tomate (Jaglo *et al.*, 2001; Hsieh *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2005), todavía se conoce poco acerca de los mecanismos y características específicas asociadas al desarrollo del daño por frío en las principales especies con interés agronómico (Sevillano *et al.*, 2009).

En este sentido, aunque no se sabe con precisión cual es la respuesta primaria del daño por frío, el modelo más aceptado apunta a los cambios físicos de la fluidez de la membrana plasmática (Lyons, 1973). Así, la transición de fase de los lípidos de la membrana desde un estado líquido-cristalino a un estado sólido-gel por efecto de las bajas temperaturas implicaría una pérdida de su permeabilidad, derivando en un desequilibrio en el intercambio de iones y metabolitos a través de la misma (Marangoni *et al.*, 1996). En última instancia, los desequilibrios metabólicos generados darán lugar a una cascada de desordenes secundarios que conducirán a las desviaciones fisiológicas asociadas al daño por frío (Wang, 1982, Parkin *et al.*, 1989). Uno de los puntos cruciales de esta transición de fase se ubica en la composición particular de ácidos grasos de la membrana y en el grado de insaturación de éstos. Así, un mayor porcentaje de insaturación está asociado a una menor temperatura de transición, la cual esta ligada a su vez con una mayor

tolerancia a las bajas temperaturas (Marangoni y Stanley, 1989; Sacandé *et al.*, 2001). No obstante, la ausencia de diferencias en la composición de los lípidos de membrana entre especies sensibles y tolerantes a frío (Patterson *et al.*, 1978; Priestley y Leopold, 1979) o un menor porcentaje de ácidos grasos insaturados en una especie de patata tolerante a las bajas temperaturas (Yamaki y Uritani, 1972) indican que este mecanismo no es universal para todas las especies vegetales, sugiriendo la existencia de otros factores responsables (ROS, hormonas, acidificación del citoplasma, etc.) en el desarrollo del daño por frío. Asimismo, en mandarinas de la variedad 'Fortune' se ha propuesto que su alta sensibilidad a las bajas temperaturas podría estar más relacionada con su incapacidad para reorganizar los lípidos de membrana que con un cambio en su nivel de insaturación (Mulas *et al.*, 1996; Mulas *et al.*, 1997).

De acuerdo a lo señalado en el apartado anterior, no resulta extraño comprobar como gran parte de los daños celulares asociados al daño por frío en frutos y hortalizas parecen estar causados por los efectos deletéreos del estrés oxidativo (Purvis *et al.*, 1995; Wang, 1995). En este sentido, dentro de los fenómenos degradativos asociados a esta acumulación de ROS destaca la peroxidación lipídica de las membranas celulares. Así, el desarrollo del daño por frío en melocotón o pepino se ha visto acompañado por un aumento en la actividad de la enzima lipoxigenasa (Wang, 2005; Mao, 2007), lo cual reafirma el papel de esta reacción oxidativa en este desorden fisiológico. Aunque en chirimoya no se ha caracterizado este aspecto durante su conservación a bajas temperaturas, el hecho de que uno de sus primeros síntomas microestructurales del daño por frío en este fruto sea la degradación de membranas apuntaría a la presencia de un estrés oxidativo (Gutiérrez *et al.*, 1992). Por otro lado, aunque las plantas han desarrollado un complejo sistema antioxidante para contrarrestar el efecto de las ROS (Mittler, 2002), existen varios estudios que reflejan una correlación entre una inhibición de algunas enzimas antioxidantes y la aparición de los síntomas del daño por frío (Prasad, 1996; Sala, 1998; Nilo *et al.*, 2010). En este sentido, se ha establecido que la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutathion reductasa (GR) o peroxidasa (APX) tiene una gran influencia sobre la tolerancia o sensibilidad de frutos y hortalizas a las bajas temperaturas (Wang, 1995; Sala y Lafuente, 1997; Wang *et al.*, 2005; Malcrida *et al.*, 2006).

El efecto de las hormonas vegetales y reguladores de crecimiento en el desarrollo del daño por frío puede ser beneficioso o perjudicial en función del tejido, la etapa del desarrollo o la temperatura de exposición. En este sentido, las poliaminas, el etileno o el ABA son los compuestos que parecen jugar un papel más importante durante la inducción y regulación del daño por frío. Las poliaminas son un grupo de compuestos nitrogenados alifáticos de bajo peso molecular que se presentan en las células de todos los seres vivos, siendo sus principales ejemplos la diamina putrescina, la triamina espermidina y la tetramina espermina (Smith, 1985). Las funcionalidades de estos compuestos son muy diversas, y entre ellas destacan el retraso de la senescencia, su acción protectora en membranas o su capacidad secuestradora de las ROS (Guye *et al.*, 1986; Faust y Wang, 1992; Ha *et al.*, 1998). Todas estas propiedades han sugerido que la síntesis de poliaminas puede estar relacionada con la respuesta de defensa de frutos y hortalizas

frente al daño por frío gracias a su papel estabilizador de la membrana plasmática (Galston y Sawhney, 1990; Valero *et al.*, 2002). En este sentido, la acumulación de espermidina en pepinos tolerantes a las bajas temperaturas o el incremento en la síntesis de putrescina en plantas de tomate apoyan el papel protector de las poliaminas frente al desarrollo del daño por frío (Shen *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002). En el caso de la chirimoya, estudios previos de nuestro grupo han indicado como el desarrollo de los síntomas del daño por frío son acompañados por unos bajos niveles de espermidina y espermina en estado libre y conjugado (Escribano y Merodio, 1994; Escribano *et al.*, 1996).

Por otro lado, el etileno es una hormona gaseosa que presenta un gran número de efectos sobre el crecimiento, desarrollo y conservación post-recolección de muchos frutos y hortalizas (Saltveit, 1999). Las similitudes observadas entre algunas de las características del proceso de maduración y el efecto de las bajas temperaturas han sugerido una posible implicación de esta hormona en el desarrollo del daño por frío (Wang, 1989; Lacan y Baccou, 1996; Lacan y Baccou, 1998). En este sentido, tanto la relación antagonista entre la síntesis de etileno y la acumulación de poliaminas (Bouchereau *et al.*, 1999; Muñoz *et al.*, 1999) como la inducción del daño por frío en frutos tratados con etileno (Chaplin *et al.*, 1983; Yuen *et al.*, 1995) apuntan en esta misma dirección. Asimismo, varios estudios han reflejado como el estrés por frío estimula la producción de etileno en diferentes frutos (Lipton y Wang, 1987; Lurie y Klein, 1991; Ben-Amor *et al.*, 1999; Zacarias *et al.*, 2003; Concellón *et al.*, 2005; Nilo *et al.*, 2010). No obstante, el efecto promotor del etileno sobre el daño por frío no puede ser generalizado a todas las especies sensibles a las bajas temperaturas, ya que existen ejemplos que demuestran el efecto beneficioso de esta hormona en la reducción de los síntomas de este desorden fisiológico (Lafuente *et al.*, 2001; Lafuente *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006). Por otro lado, la descoordinación en la reacción de conversión entre el precursor metabólico del etileno (ACC; 1-aminociclopropano-1-carboxílico) y el etileno por efecto del frío parece explicar en parte la maduración incompleta de muchos frutos tras ser conservados a bajas temperaturas durante largos periodos de tiempo (Jackson *et al.*, 1988). En este sentido, el bloqueo en la síntesis autocatalítica de etileno y la acumulación de ACC son fenómenos característicos de la conservación de la chirimoya a temperaturas de daño (Alique *et al.*, 1994; Muñoz *et al.*, 1999).

Tal y como hemos reflejado con anterioridad, el ABA está implicado en la respuesta de las plantas al estrés por frío, siendo también un regulador común en otros tipos de estrés abiótico asociados a alteraciones hídricas (Zeevart *et al.*, 1988; Ingram y Bartels, 1996). En relación a la conservación a bajas temperaturas, se ha observado que un aumento en la acumulación de ABA se trata de una de las respuestas generales de frutas y hortalizas asociadas al aumento de la tolerancia a las bajas temperaturas (Kawada *et al.*, 1979; Ryu y Lui, 1994; Wang, 1994; Janowiak *et al.*, 2002). En este sentido, la aplicación exógena de ABA a especies sensibles a las bajas temperaturas incrementa su tolerancia al frío (Pardossi *et al.*, 1992; Anderson *et al.*, 1994; Prasad *et al.*, 1994b). No obstante, actualmente no se conoce con exactitud cual es el mecanismo fisiológico del ABA en la reducción del daño por frío. Se ha sugerido que su implicación en la regulación del cierre estomático podría prevenir la deshidratación asociada a la conservación a

bajas temperaturas (Christiansen y Ashworth, 1978). Por otro lado, otros autores han especulado con una interacción entre esta hormona y los lípidos de la membrana plasmática, aumentando su fluidez a bajas temperaturas (Markhart, 1986).

La investigación del efecto de la conservación a bajas temperaturas sobre la síntesis y degradación de proteínas en los tejidos de plantas sensibles al daño por frío refleja resultados variables, lo cual puede ser debido a las diferencias en la especie, el tipo de tejido y en la severidad del estrés. Así, se ha descrito como la síntesis de algunas enzimas clave en el metabolismo disminuye significativamente cuando plantas y frutos son expuestas a bajas temperaturas (Hahn y Walbot, 1989; Bruggemann *et al.*, 1994). Por otro lado, un análisis proteómico de hojas de arroz con síntomas de daño por frío reveló un aumento en la degradación de proteínas fotosintéticas (Yan *et al.*, 2006). Asimismo, en chirimoya, se ha observado un importante aumento de la actividad proteolítica endógena por efecto de la conservación a temperaturas inductoras del daño frío (Montero *et al.*, 1995). No obstante, Watkins *et al.* (1990) sugieren que la conservación de tomates a bajas temperaturas durante largos periodos de tiempo también induce la síntesis de proteínas específicas en el fruto. En este sentido, Cui *et al.* (2005) han demostrado en arroz un aumento de la expresión de aquellas proteínas responsables de la síntesis y control de calidad de otras proteínas durante el estrés por bajas temperaturas, indicando la necesidad de una biosíntesis activa de proteínas bajo estas condiciones de conservación.

Por otro lado, dentro de las respuestas específicas de los tejidos de las plantas al frío, cabe destacar los cambios en los niveles de expresión y en la actividad de la enzima L-fenilalanina amonio-liasa (PAL, *phenylalanine ammonia lyase*). Aunque el aumento de la actividad PAL y la acumulación derivada de fenilpropanoides ha sido relacionado con un mecanismo de defensa a las bajas temperaturas (Christie *et al.*, 1994; Lafuente *et al.*, 2001; Janas *et al.*, 2002; Solecka y Kacperska, 2003; Wang *et al.*, 2007), otros estudios han reflejado una correlación entre la inducción de esta enzima y el desarrollo del daño por frío en frutos y hortalizas como berenjenas (Kozukue y Ogata, 1972), cítricos (Martínez-Téllez y Lafuente, 1997; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2000; Lafuente *et al.*, 2003), chirimoya (Maldonado *et al.*, 2002b) o plátano (Nguyen *et al.*, 2003). En este sentido, se ha sugerido que la enzima PAL podría servir como un marcador bioquímico del daño por frío en cítricos (Sala *et al.*, 2005). Asimismo, la acumulación del transcrito de la PAL en uvas conservadas a 0 °C podría actuar como un indicador de la percepción al frío en especies tolerantes a las bajas temperaturas (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2007).

Por último, algunos de los importantes cambios observados en la textura del mesocarpo de muchos frutos dañados por el frío han sido asociados a cambios en las enzimas hidrolíticas de la pared celular como la endopoligalacturonasa (EndoPG), pectin metilesterasa (PME), β -galactosidasa y 1,4- β -glucanasa. Por ejemplo, en papaya, la conservación a bajas temperaturas acelera la maduración e incrementa la actividad de estas hidrolasas, aumentando la solubilización y despolimerización de las pectinas de pared (Ali *et al.*, 2004). En sentido contrario, se ha descrito el retraso en la maduración de aguacates conservados a 7 °C por una menor acumulación de los transcritos que codifican alguna de estas enzimas (Dopico *et al.*, 1993). Asimismo, el análisis proteómico del mesocarpo de melocotones conservados a bajas temperaturas reafirma la

importancia de las enzimas EndoPG y PME durante el desarrollo de este desorden fisiológico (Nilo *et al.*, 2010). Por todo ello, se ha sugerido que las actividades EndoPG, PME y β -galactosidasa podrían jugar un papel importante en el daño por frío de los frutos sensibles a las bajas temperaturas (Zhou *et al.*, 2000). No obstante, hay que tener en cuenta que la composición de la pared celular refleja un equilibrio entre la síntesis y la hidrólisis de sus componentes, observándose evoluciones diferentes de la textura en otros frutos conservados a bajas temperaturas. En este sentido, el desarrollo del daño por frío en algunos frutos como la chirimoya (Maldonado *et al.*, 2002b) o el níspero (Cao *et al.*, 2009) implica un mantenimiento o un aumento de la firmeza. En ambos estudios se atribuye el origen de este fenómeno a un incremento del contenido de lignina y al papel jugado por este compuesto en el entrecruzamiento de los componentes de la pared celular (Lewis y Yamamoto, 1990).

2.5.- Papel protector de las proteínas PR durante el estrés por frío

Aunque la mayoría de las clases de proteínas PR parece jugar un importante papel en los mecanismos de defensa inducidos por el ataque de patógeno, resulta curioso observar como en los últimos años diferentes estudios revelan que una gran variedad de estas proteínas son inducidas por el efecto de las bajas temperaturas. En este sentido, los transcritos de proteínas PR-1, PR-2, PR-3, PR-5, PR-9, PR-13 y PR-14 se acumulan durante la aclimatación al frío el trigo de invierno (Gaudet *et al.*, 2000; Kuwabara *et al.*, 2002; Gaudet *et al.*, 2003a; Gaudet *et al.*, 2003b). Asimismo, proteínas PR-2, PR-3 y PR-5 se acumulan a lo largo del mismo proceso en plantas de centeno de invierno (Hon *et al.*, 1995). Del mismo modo, se ha descrito la acumulación de proteínas PR-5 apoplásticas en cacahuete (Dave y Mitra, 1998) y castaña (García-Casado *et al.*, 2000). En el caso de uvas conservadas a bajas temperaturas también se observó una acumulación de los transcritos de proteínas PR-2 y PR-3 (Romero *et al.*, 2006). Por otro lado, diferentes proteínas PR-10 de un conjunto variable de especies se encuentran reguladas estacionalmente, acumulándose intensamente en invierno (Ekramoddoullah *et al.*, 1995; Ekramoddoullah *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000; Ukaji *et al.*, 2004; Wisniewski *et al.*, 2004). También se ha detectado una fuerte inducción de defensinas (PR-12) a lo largo de la aclimatación del frío de trigo de invierno y melocotón (Koike *et al.*, 2002; Wisniewski *et al.*, 2003). Igualmente, se ha cuantificado la acumulación de transcritos de proteínas PR-14 en castañas, coles y pimientos tratados con bajas temperaturas (García-Casado *et al.*, 2000; Hinch *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2003). En este sentido, una proteína PR-14 de cebada fue inducida tanto durante la aclimatación al frío (Pearce *et al.*, 1996) como tras la infección por patógenos (Molina y García-Olmedo, 1993). Todos estos estudios sugieren que la mayoría de las clases de las proteínas PR, incluyendo quitinasas y 1,3- β -glucanasas, están implicadas de alguna manera en la respuesta de la planta a las bajas temperaturas.

Como hemos señalado en el apartado 2.3, el estudio en extractos intercelulares de plantas de centeno aclimatadas a las bajas temperaturas permitió detectar la presencia de proteínas caracterizadas por una moderada actividad anticongelante, una elevada similitud de secuencia con

proteínas PR-2, PR-3 y PR-5 y una significativa actividad hidrolítica (Hon *et al.*, 1995; Yeh *et al.*, 2000; Yaish *et al.*, 2006). Esta actividad anticongelante se tradujo en un retraso del proceso de congelación, aumentando las probabilidades de supervivencia de la planta durante el invierno (Griffith *et al.*, 2003). Curiosamente, la infección de estas plantas con patógenos o su tratamiento con SA o ABA a temperaturas templadas indujo la acumulación de un grupo de proteínas PR similares a las observadas durante la aclimatación a bajas temperaturas. Sin embargo, aunque dichas proteínas también mostraron actividades hidrolíticas y antifúngicas, carecieron de actividad anticongelante alguna (Hiilovaara-Teijo *et al.*, 1999; Yu y Griffith, 2001; Yu *et al.*, 2001). En este sentido, se ha hipotetizado que estas diferencias en sus actividades están originadas en la inducción de isoformas ligeramente diferentes mediante duplicación génica, puesto que no han sido detectadas modificaciones post-traduccionales en las proteínas procedentes de plantas aclimatadas y no aclimatadas (Yeh *et al.*, 2000). Por otro lado, aunque la ruta de señalización de estas quitinasas y 1,3- β -glucanasas con doble funcionalidad (antifúngica y anticongelante) es todavía desconocida, parece que es independiente de los mecanismos de defensa activados por patógenos (Kuwabara e Imai, 2009). Asimismo, todo estos estudios indicados nos llevan a la conclusión de que las presiones evolutivas ejercidas sobre determinadas especies de monocotiledóneas han dando lugar a una estrategia consistente en la producción de proteínas PR bifuncionales.

No obstante, en la bibliografía también existen varios ejemplos de proteínas PR que muestran funcionalidades crioprotectoras adicionales y que no poseen la capacidad de inhibir la recrystalización del hielo. En este sentido, se ha descrito la actividad crioprotectora de una 1,3- β -glucanasa de clase I de tabaco frente a la membrana de tilacoides (Hinch *et al.*, 1997) o el efecto crioprotector de una proteína PR-5 de dulcamara (Newton y Duman, 2000) y de una quitinasa de clase II (Kikuchi *et al.*, 2009) sobre protoplastos sometidos a tratamientos de congelación-descongelación. Asimismo, se ha observado el efecto crioprotector de una proteína PR-5 de cacahuate (Dave y Mitra, 1998), una proteína PR-10 de morera (Ukaji *et al.*, 2004) o una 1,3- β -glucanasa y una quitinasa de clase I de uva de mesa (Romero *et al.*, 2008; Fernandez-Caballero *et al.*, 2009) sobre una enzima lábil a las bajas temperaturas (LDH) tras varios ciclos de congelación-descongelación. Cuantitativamente, estas últimas actividades crioprotectoras suelen situarse en niveles inferiores a los encontrados para las dehidrinas inducidas por el frío (Bravo *et al.*, 2003). No obstante, y al igual que este último grupo de proteínas, el mecanismo por el cual algunas proteínas PR presentan estas capacidades crioprotectoras permanece sin dilucidar.

2.6.- Tolerancia inducida a las bajas temperaturas en frutos y hortalizas por la aplicación de tratamientos post-recolección

2.6.1.- Definición y características de los tratamientos post-recolección

Aunque muchas especies de alto interés agronómico, como tomate o cítricos, son sensibles a las bajas temperaturas e incapaces de aclimatarse al frío, la aplicación de diferentes tratamientos post-recolección permite una reducción del desarrollo del daño por frío a través de

un aumento de la tolerancia de los tejidos vegetales a las bajas temperaturas o de un retraso en el desarrollo de los síntomas (Wang, 2000). Aunque obviamente el mejor paliativo es la prevención, manteniendo los productos a una temperatura superior al umbral de daño, se han propuesto diversos métodos físicos y químicos para reducir la intensidad de los desordenes fisiológicos causados por las bajas temperaturas. No obstante, la mayor parte de las tecnologías aplicadas a nivel industrial se fundamentan en la modificación de alguno o varios parámetros físicos como la temperatura y la humedad relativa, o en la variación de la composición gaseosa de la atmósfera durante la conservación a bajas temperaturas (Kader *et al.*, 1989; Wang, 1990b; Exama *et al.*, 1993; Lurie, 1998; Beaudry, 1999; Fallik, 2004).

2.6.1.1.- Atmósferas controladas, modificadas y pretratamientos con CO₂

La utilización de atmósferas modificadas (MA, *modified atmospheres*) o controladas (CA, *controlled atmospheres*) fundamentan su efectividad en la reducción de la incidencia del daño por frío mediante el establecimiento de una atmósfera caracterizada por bajas concentraciones de O₂ y/o altas concentraciones de CO₂. En este sentido, el control continuo de los niveles de estos dos gases durante la aplicación de CA contribuye a mantener la calidad y prolonga el periodo de la conservación de productos vegetales, habiendo demostrado efectos beneficiosos en melocotón (Wade, 1981), piña (Paull, 1990), aguacate (Meir *et al.*, 1995), guayaba (Singh y Pal, 2008) o uva (Artés-Hernández *et al.*, 2004).

Por otro lado, la aplicación fundamental de la MA está basada en el embolsado de frutos y hortalizas con diferentes películas poliméricas que muestran diferentes permeabilidades al vapor de agua o a los gases atmosféricos. De este modo, durante la conservación se genera de un modo natural una atmósfera modificada como resultado del consumo de O₂ y producción de CO₂ del producto y la difusión gaseosa selectiva. En este sentido, son recomendables porcentajes de 3-8 % CO₂ y 2-5 % O₂ en la conservación de frutos y hortalizas (Farber, 1991). Asimismo, el empleo de esta tecnología durante la conservación a bajas temperaturas está más extendido que otros tratamientos post-recolección gracias a su sencilla implantación, bajo coste y elevados beneficios resultantes (Kader *et al.*, 1989). En concreto, se han descrito efectos inhibitorios de los síntomas del daño por frío en diferentes productos como pimiento (Serrano *et al.*, 1997), aguacate (Meir *et al.*, 1997), plátano (Nguyen *et al.*, 2004), mango (Pesis *et al.*, 2000) o cereza (Remón *et al.*, 2000).

El establecimiento de cortos pretratamientos con elevadas concentraciones de CO₂ (10-35 %) inmediatamente después de la recolección y antes o durante la conservación a bajas temperaturas también se ha utilizado en la reducción del desarrollo de los síntomas de daño por frío y en el aumento de la vida comercial útil de limón (Bertolini *et al.*, 1991), aguacate (Pesis *et al.*, 1994) o uva (Romero *et al.*, 2006).

No obstante, hay que tener en cuenta que la exposición de frutos y hortalizas a bajas concentraciones de O₂ y/o altas concentraciones de CO₂ origina un estrés anaerobio que puede llegar a ser perjudicial en función de los niveles de estos gases, la temperatura y periodo de conservación o la especie en particular. Puesto que estas condiciones alteran la tasa respiratoria y la actividad metabólica, la aplicación a un producto de concentraciones por encima de su rango

de tolerancia puede provocar la inducción de metabolismos fermentativos, el desarrollo de sabores extraños o una maduración irregular (Lurie y Pesis, 1992; O'Hare y Prasad, 1993; Ke *et al.*, 1994; Pérez y Sanz, 2001). En este sentido, Watkins (2000) ha agrupado las concentraciones de CO₂ dañinas para los principales frutos y hortalizas. Así, en dicho estudio se plasma el amplio intervalo de tolerancia entre las diferentes especies, oscilando entre un 2 % para la pera a más de un 25 % para la chirimoya.

La aplicación de CA ha sido una de las técnicas más utilizadas y analizadas en la conservación a bajas temperaturas de la chirimoya (Merodio y De La Plaza, 1997). Por ejemplo, el empleo de atmósferas con concentraciones de 3 % O₂ y 3 % CO₂ o 3 % O₂ y 6 % CO₂ ampliaron 2 semanas el periodo de conservación de chirimoyas 'Fino de Jete' a 9 °C (Alique y Oliveira, 1994). No obstante, la utilización en esta variedad de cortos pretratamientos con altas concentraciones de CO₂ durante la conservación a temperaturas inferiores a la crítica ha sido el tratamiento post-recolección más efectivo en el control del daño por frío. Los diferentes estudios realizados han establecido que la aplicación de una atmósfera de 20 % O₂ + 20 % CO₂ durante 3 días a 6 °C tienen un persistente efecto residual y mejoran la tolerancia del fruto a las bajas temperaturas (Escribano *et al.*, 1997; Merodio *et al.*, 1998; Muñoz *et al.*, 1999; Maldonado *et al.*, 2002a; Maldonado *et al.*, 2004). Asimismo, el empleo de este pretratamiento a temperatura ambiente retrasa los cambios asociados a la maduración y senescencia de los tejidos verdes (Del Cura *et al.*, 1996; Muñoz *et al.*, 1997; Muñoz *et al.*, 1999). Por otro lado, mientras que la utilización de periodos de tiempo de pretratamiento menor (1 día) no mostró efectos beneficiosos relevantes, el aumento hasta 6 días generó varios síntomas de daños estructurales (Muñoz, 2000; Maldonado *et al.*, 2002b).

2.6.1.2.- Tratamientos térmicos

La aplicación de tratamientos post-recolección con altas temperaturas ofrece considerables ventajas al aumentar la tolerancia al frío y disminuir la incidencia de podridos en diferentes frutos y hortalizas. Asimismo, otros beneficios adicionales como la ausencia de residuos tras su utilización, su fácil implementación a nivel industrial y bajo coste sitúan a estos tratamientos como una alternativa a las CA o MA (Woolf *et al.*, 1995; Lafuente *et al.*, 1997; Lurie y Sabehat, 1997; Zhang *et al.*, 2005; Mulas y Schirra, 2007; Ghasemnezhad *et al.*, 2008). En este sentido, se han desarrollado diferentes procedimientos en el establecimiento de esta tecnología, destacando el acondicionamiento a altas temperaturas o los tratamientos de calor intermitentes. El primero consiste en la aplicación de altas temperaturas no letales al fruto u hortaliza durante un periodo de tiempo variable antes de la conservación a bajas temperaturas. En lo que respecta a las formas de aplicar el calor, se han usado diversos métodos como los baños de agua caliente (HWD, *hot water dipping*), vapor de agua, aire caliente o mediante aspersión de agua caliente y cepillado (HWRB, *hot water rinsing and brushing*). Asimismo, varios estudios recomiendan la utilización de tratamientos cortos como el HWD o HWRB ya que no modifican los parámetros de calidad del fruto como otros tratamientos más prolongados (Lurie, 1998; Porat *et al.*, 2000; Fallik, 2004). No obstante, la eficacia de este tratamiento de calor en la mejora de la calidad refleja resultados muy variables, estando condicionada por factores como la especie, la variedad, el

estado de desarrollo del fruto u hortaliza, la combinación de tiempo-temperatura aplicada o el modo de transmisión de calor. En este sentido, una aplicación inadecuada puede generar síntomas de daño externos como pardeamientos y depresiones de la piel o malos olores (Schirra y D'hallewin, 1997; Lurie, 1998; Paull y Chen, 2000).

Por otro lado, los tratamientos de calor intermitentes consisten en la aplicación de aumentos periódicos de temperatura durante la conservación a bajas temperaturas de frutos y hortalizas. Su efectividad ha sido demostrada en la reducción del daño por frío en pimiento (Wang y Baker, 1979), cítricos (Artés *et al.*, 1998; Schirra y Cohen, 2000), tomate (Artés y Escriche, 1994), melocotón (Fernández-Trujillo y Artés, 1997) o nectarina (Lill, 1985). La principal dificultad asociada a la aplicación de este tratamiento se encuentra en obtener las condiciones óptimas de temperatura, duración y frecuencia, ya que la interrupción de la conservación a bajas temperaturas una vez que los síntomas de daño por frío son irreversibles únicamente aceleran el desarrollo de este desorden fisiológico.

2.6.1.3.- Tratamientos químicos

El mencionado efecto de algunas hormonas vegetales endógenas y reguladores de crecimiento en el desarrollo del daño por frío fundamenta la aplicación de diferentes tratamientos químicos en la conservación a bajas temperaturas de frutos y hortalizas. En este sentido, la correlación existente en muchas especies entre la producción de etileno y el daño por frío ha llevado al establecimiento de diferentes técnicas que inhiban la producción y/o la acción de esta hormona (Serek *et al.*, 1995; Ben-Amor *et al.*, 1999). Por ejemplo, la utilización de un antagonista del etileno como el 1-metilciclopropano (1-MCP) ha demostrado su utilidad en la reducción de los síntomas del daño por frío en ciruela (Candan *et al.*, 2008) o piña (Selvarajah *et al.*, 2001). No obstante, existen estudios con 1-MCP que demuestran su papel inductor del daño por frío en aquellas especies y/o variedades donde el etileno ejerce un efecto beneficioso en este desorden fisiológico (Porat *et al.*, 1999; Dong *et al.*, 2002). Por otro lado, el empleo de tratamiento con otros compuestos como poliaminas, metil jasmonato o metil salicilato han demostrado también su eficacia en el aumento de la tolerancia al daño por frío (Meir *et al.*, 1996; Ding *et al.*, 2002; González-Aguilar *et al.*, 2004; Nair y Singh, 2004).

2.6.2.- Cambios fisiológicos y bioquímicos asociados a la tolerancia inducida a las bajas temperaturas

Si lo comparamos con los mecanismos de tolerancia establecidos por las plantas frente a otros tipos de estrés abiótico como la congelación, el calor, hídrico o salino, todavía se desconoce gran parte de las características del modo de acción de los tratamientos post-recolección en el aumento de la tolerancia inducida a las bajas temperaturas. No obstante, la mayoría de los cambios fisiológicos y bioquímicos descritos durante este proceso apuntan a modificaciones de la membrana lipídica, cambios en el sistema de defensa antioxidante, acumulación de algunos solutos compatibles y la inducción de determinadas proteínas asociadas al aumento de esta tolerancia. Por otro lado, la protección frente al daño por frío proporcionada por estos

tratamientos post-recolección puede ser explicada a través de la existencia en plantas de un fenómeno de resistencia cruzada a diferentes condiciones de estrés. En este sentido, la exposición de un fruto u hortaliza a un estrés moderado como el descrito en la aplicación de CA/MA o en un choque térmico no sólo protege al organismo frente a este tipo de estrés, sino que también induce una tolerancia a otros tipos de estrés de acuerdo al entrecruzamiento entre las rutas de señalización descrito anteriormente (Wang *et al.*, 2003).

La eficacia de un tratamiento de acondicionamiento térmico en calabacín conservado a bajas temperaturas ha sido relacionada con cambios en la relación esterol/fosfolípidos y la fluidez de la membrana plasmática (Wang *et al.*, 1992). Asimismo, se ha observado la existencia de una correlación en tomate entre el grado de insaturación de los lípidos de membrana y su tolerancia inducida a las bajas temperaturas por la aplicación de un diferentes tratamientos de acondicionamiento térmico (Lurie *et al.*, 1997). Además, Sapinitskaya *et al.* (2006) han sugerido la participación de genes del metabolismo de lípidos en la tolerancia al frío de pomelo. Sin embargo, otros estudios en cítricos han demostrado que el efecto beneficioso de los tratamientos post-recolección en el retraso de la aparición del daño por frío no implica cambios significativos en el grado de insaturación de los ácidos grasos analizados (Mulas *et al.*, 1997; Schirra y Cohen, 1999).

Por otro lado, varios estudios han demostrado como el incremento del potencial defensivo frente al estrés oxidativo implicado en el daño por frío forma parte de los efectos de muchos tratamientos post-recolección en diferentes frutos y hortalizas. Así se ha descrito un incremento en la actividad de las enzimas del sistema antioxidante (SOD, CAT, APX y GR) en frutos de mandarina 'Fortune' tras su acondicionamiento térmico (Sala y Lafuente, 1999). En este sentido, Wang (1995) ha establecido como la tolerancia al frío inducida en calabacines por el acondicionamiento térmico está relacionada con el aumento de la actividad de la enzima GR. Asimismo, un estudio realizado en melocotón conservados en MA indicó como la disminución de la actividad de las enzimas CAT y SOD está unida al desarrollo del daño por frío en este fruto (Wang *et al.*, 2005). Igualmente, varios autores han reflejado la importancia de la activación de la vía de la respiración alternativa mediada por la oxidasa alternativa (AOX, *alternative oxidase*), evitando la síntesis de ROS (Fung *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2008). En otro orden, la sobreexpresión de los genes que codifican a APX, SOD y CAT incrementan la tolerancia a las bajas temperaturas (Van Breusegem *et al.*, 1999; Payton *et al.*, 2001), mientras que la represión de la expresión del gen que codifica a CAT incrementa el daño por frío (Kerdnaimongol y Woodson, 1999).

En lo que concierne a los cambios en los niveles de poliaminas, varios trabajos han indicado que una mayor acumulación o mantenimiento de los niveles de estos compuestos está relacionada con la tolerancia a diferentes tipos de estrés (Kramer y Wang, 1989; Chattopadhyay *et al.*, 2002; Nayyar y Chander, 2004). En concreto, la aplicación de atmósferas controladas y otros tratamientos post-recolección dirigidos a reducir el daño por frío se ha asociado a un aumento en las concentraciones de poliaminas, especialmente espermidina y espermina (Philosoph-Hadas *et al.*, 1993; Wang, 1993; Rodov *et al.*, 1995). En este sentido, estudios realizados en chirimoya por nuestro grupo han indicado como la aplicación de pretratamientos

con altas concentraciones de CO₂ activan la biosíntesis de poliaminas, principalmente espermidina y espermina, confirmando así su papel protector (Escribano *et al.*, 1997; Merodio *et al.*, 1998; Muñoz *et al.*, 1999). Asimismo, puesto que este fruto sufre una acidificación del citoplasma durante el desarrollo del daño por frío (Muñoz *et al.*, 2001), se ha hipotetizado con que parte de los efectos beneficiosos de estos compuestos nitrogenados se encontraría en sus propiedades tamponantes de pH. Por otro lado, no se ha encontrado una correlación causal clara entre la inducción de los niveles de poliaminas en mandarina 'Fortune' y la tolerancia inducida a las bajas temperaturas por tratamientos de acondicionamiento térmico (González-Aguilar *et al.*, 1997; González-Aguilar *et al.*, 1998; González-Aguilar *et al.*, 2000).

Al contrario que durante la aclimatación al frío, no existe demasiada información sobre la implicación en los cambios en otros solutos compatibles como carbohidratos o prolina durante la tolerancia inducida a las bajas temperaturas en frutos y hortalizas. No obstante, la aplicación de diferentes tratamientos de acondicionamiento térmico en tomates se ha visto acompañado por la acumulación de urónidos (Mitcham y McDonald, 1992) y sólidos solubles (Lurie y Klein, 1991). En este sentido, otros autores han descrito como la aplicación de tratamientos térmicos dirigidos al aumento de la tolerancia al frío implicó un mantenimiento de los niveles de sacarosa con respecto a los frutos no tratados (Lingle y Dunlap, 1987; Holland *et al.*, 2002; Holland *et al.*, 2005). Por otro lado, en pomelo se ha observado que los tratamientos de acondicionamiento térmico implican un descenso de los niveles de azúcares (Purvis y Yelenosky, 1982; Purvis, 1985). En estos mismos trabajos se ha descrito como simultáneamente se produce un aumento en la concentración de prolina. No obstante existen datos contradictorios sobre el papel de este aminoácido en el desarrollo de la tolerancia a las bajas temperaturas en frutos. Así, la aplicación de diferentes tratamientos post-recolección a pomelos conservados a bajas temperaturas han reflejado una relación entre un menor desarrollo de los síntomas del daño por frío y bajas concentraciones de prolina (Ezz *et al.*, 2004).

Asimismo, varios autores han sugerido que determinados genes inducidos ante otros tipos de estrés también podrían estar implicados en la obtención de una tolerancia a las bajas temperaturas en frutos y hortalizas. En este sentido, se ha comprobado como el efecto beneficioso de algunos tratamientos post-recolección está relacionado con la inducción de la síntesis de proteínas de choque térmico (HSPs, *heat shock proteins*) o de dehidrinas (Sabehat *et al.*, 1998; Ismail *et al.*, 1999; Sung *et al.*, 2001). Así, se ha comprobado que muchas especies de plantas responden a un choque térmico con la acumulación de HSPs, permitiendo el desarrollo de una protección frente a dicho estrés gracias a su papel como chaperonas moleculares (Vierling, 1991; Vierling y Kimpel, 1992; Sabehat *et al.*, 1996; Saltveit, 2005). Hay que tener en cuenta que durante el desarrollo del estrés se produce la desnaturalización y disfunción de muchas proteínas, por lo que las HSPs ayudan a proteger al organismo frente a dicho estrés controlando el adecuado plegamiento y conformación de proteínas estructurales y funcionales (Vinocour y Altman, 2005). No obstante, aunque la síntesis de HSPs se demostró primero tras la aplicación de altas temperaturas, se han encontrado otras situaciones y desordenes fisiológicos de las plantas (maduración fruto, bajas temperaturas, estrés oxidativo, etc.) donde se produce una acumulación

significativa (Lee *et al.*, 2000; López-Matas *et al.*, 2004; Neta-Sharir *et al.*, 2005; Nilo *et al.*, 2010). En este sentido, la aplicación de un estrés térmico a través de un acondicionamiento térmico o la utilización de tratamientos químicos basados en metil jasmonatos y metil salicilatos sobre frutos y hortalizas ha inducido la síntesis de HSPs en el marco del fenómeno de tolerancia cruzada al estrés (Woolf *et al.*, 1995; Kadyrzhanova *et al.*, 1998; Ding *et al.*, 2001; Rozenzweig *et al.*, 2004).

Por otro lado, varios estudios han descrito el incremento de la expresión de los genes que codifican dehidrininas en la respuesta de determinados cítricos al frío (Cai *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 1999) o la acumulación de estas proteínas en el mesocarpio de melocotón durante la conservación a bajas temperaturas (Ogundiwin *et al.*, 2008; Nilo *et al.*, 2010). No obstante, la inducción de dehidrininas ante el estrés salino o la exposición a ABA, sugieren que forma parte de una respuesta universal de las plantas ante aquellos tipos de estrés que acontecen en condiciones de deshidratación (Close, 1997; Xiao y Nassuth, 2006; Wisniewski *et al.*, 2006). Por otro lado, tanto la actividad crioprotectora de dehidrininas procedentes de cítricos (Hara *et al.*, 2001; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2004), melocotón (Wisniewski *et al.*, 1999) o espinaca (Kazuoka y Oeda, 1994) como la actividad anticongelante de una dehidrina de melocotón (Wisniewski *et al.*, 1999) apoyan su papel crioprotector de membranas y macromoléculas. En este sentido, la aplicación de tratamientos térmicos sobre pomelos ha demostrado como la tolerancia a las bajas temperaturas se encuentra relacionada con una prevención del descenso de la expresión de la dehidrina *cor15* (Porat *et al.*, 2002b) o el aumento de los niveles de una nueva dehidrina (Sapitnitskaya *et al.*, 2006). Asimismo, se ha identificado en flavedo de cítricos la presencia de dos genes que codifican dehidrininas, aumentando la expresión de uno de ellos tras la utilización de un tratamiento térmico o tras la aplicación de otros factores de estrés como radiación UV o etileno (Porat *et al.*, 2004b). Por el contrario, este fenómeno no parece general ya que un tratamiento de acondicionamiento térmico sobre mandarinas ‘Fortune’ implicó un descenso de los niveles del transcrito del gen de una dehidrina (*Crror15*) durante su conservación a bajas temperaturas (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2004).

La presencia de diferentes clases de estrés abiótico también ha mostrado su influencia sobre la regulación génica y los niveles de actividad de quitinasas y 1,3- β -glucanasas de diferentes frutos y hortalizas. En este sentido, en frutos de cítricos se ha establecido la inducción en la expresión de genes de 1,3- β -glucanasas por la aplicación de diferentes tipos de estrés abiótico (Porat *et al.*, 2002a). Asimismo, se ha observado como la aplicación de radiación UV-C sobre melocotones o uvas implicó una rápida acumulación de los transcritos de varios genes de defensa, entre los que destacaron quitinasas y 1,3- β -glucanasas (El Ghaouth *et al.*, 2002; Bonomelli *et al.*, 2004). Por otro lado, la aplicación de un tratamiento de acondicionamiento térmico sobre naranjas ‘Navelate’ provocó un incremento en la expresión de los genes que codifican quitinasas y 1,3- β -glucanasas, correlacionándose con un aumento en la resistencia al patógeno *Penicillium digitatum* (Ballester *et al.*, 2010). En el caso del frío, se ha identificado la acumulación de un gen que codifica una 1,3- β -glucanasa de clase III en mandarina ‘Fortune’ como respuesta a la conservación a bajas temperaturas, sugiriendo que este gen es un marcador molecular del daño por frío (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2006). Igualmente, estudios de nuestro grupo han establecido en

uva de mesa ‘Cardinal’ una correlación entre el aumento en la expresión de los genes de una quitinasa y una 1,3- β -glucanasa de clase I y el periodo de conservación de los frutos a 0 °C (Romero *et al.*, 2006). En este sentido, el estudio de la funcionalidad de estas dos proteínas tras su expresión heteróloga en *E. coli* sugirió la participación de ambas enzimas en la respuesta de tolerancia de la uva a las bajas temperaturas (Romero *et al.*, 2008; Fernandez-Caballero *et al.*, 2009). Hasta el momento hay poca información concerniente al efecto de los tratamientos post-recolección en los cambios observados en las quitinasas y 1,3- β -glucanasas. No obstante, el tratamiento de frutos de tomate conservados a bajas temperaturas con metil jasmonato o metil salicilato provocó tanto un aumento de la tolerancia al frío como la inducción de la expresión de varios genes de quitinasas y 1,3- β -glucanasas (Ding *et al.*, 2002). Asimismo, en frutos cítricos, se ha identificado un gen que codifica una quitinasa ácida de clase II que aumentaba su expresión en mandarina ‘Fortune’ tras un acondicionamiento térmico, manteniéndose sus niveles durante la conservación del fruto a bajas temperaturas (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003). Por otro lado, en chirimoya ‘Fino de Jete’, nuestro grupo ha establecido que la mejora en la tolerancia a las bajas temperaturas por un pretratamiento con altas concentraciones de CO₂ está asociada al incremento en la acumulación de dos isoenzimas quitinasa, de 41 y 38 kDa, y una 1,3- β -glucanasa de 54 kDa detectadas en los frutos recién recolectados (Merodio *et al.*, 1998). En este sentido, todos estos resultados, junto a los antecedentes expuestos en el apartado 2.6 o la reciente correlación entre la expresión de un gen que codifica una quitinasa y el incremento a la tolerancia al calor, al estrés salino o la deshidratación (Kwon y Kim, 2007), apuntan que las quitinasas y 1,3- β -glucanasas podrían ser unos buenos candidatos implicados en las respuestas de defensa asociadas a los mecanismos que confieren tolerancia inducida a las bajas temperaturas por la aplicación de tratamientos post-recolección a frutos y hortalizas.

OBJETIVOS



El objetivo general de esta Tesis Doctoral es el estudio de la implicación de quitinasas y 1,3- β -glucanasas en la respuesta de defensa de chirimoya a bajas temperaturas de conservación (6 °C) y en el mecanismo de tolerancia activado por el pretratamiento con 20 % de CO₂. Para la consecución del objetivo general se han desarrollado los siguientes objetivos específicos:

- 1- Definir el patrón de inducción isoenzimático de proteínas ácidas y básicas, funcional e inmunológicamente relacionadas con las proteínas PR quitinasa (PR-3) y 1,3- β -glucanasa (PR-2), durante la maduración y conservación.
- 2- Establecer la estrategia de defensa activa en el fruto mediante el análisis de la relación entre el patrón de expresión de isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa y los cambios en la actividad hidrolítica, antifúngica y crioprotectora.
- 3- Caracterizar a nivel bioquímico, cinético y funcional aquellas isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa inducidas por bajas temperaturas o elevadas concentraciones de CO₂, a fin de establecer si la respuesta de defensa o de tolerancia al estrés por frío puede explicarse de acuerdo a los cambios en su expresión y características funcionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Material vegetal

1.1.- Recolección y selección de frutos

Se utilizaron frutos de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) de la variedad Fino de Jete procedentes de la Cooperativa Virgen de Bodigar, en Almuñecar (Granada) recolectadas en el mes de diciembre durante la campaña de 1997. Se realizó una primera selección de los frutos con el grado de madurez fisiológica adecuado en la misma explotación, siguiendo el criterio tradicional que se basa en los cambios del color de la piel (Gardiazabal y Rosenberg, 1993). A continuación estos frutos se transportaron al Instituto del Frío (Madrid) en un vehículo no refrigerado. Una vez recibidos en el laboratorio, se procedió a una segunda selección más restrictiva, eliminando todos aquellos que presentaban lesiones en la superficie (coloración irregular, pardeamientos o punteaduras). Adicionalmente se buscó la uniformidad de peso, seleccionando frutos en el rango 350 ± 20 g.

1.2.- Condiciones de conservación post-recolección de los frutos

Los frutos seleccionados fueron divididos en 8 lotes de 20 frutos cada uno de ellos y colocados en el interior de frascos de respiración de 22 L que se distribuyeron en dos cámaras frigoríficas semi-industriales equipadas con termopares, en oscuridad y mantenidas a 20 °C (temperatura de maduración) y 6 °C (temperatura de daño) con una oscilación de ± 0.5 °C. Para cada temperatura, dos lotes de frutos fueron utilizados como control y otros dos lotes para el ensayo del tratamiento con altas concentraciones de CO₂ (20 %). Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado, considerándose como replicas los frascos de respiración. Para los frutos control se estableció un flujo continuo de aire humidificado de 180 mL · min⁻¹ con una humedad relativa del 85-90 %. Para los frutos tratados se realizó un pretratamiento, durante 3 días, con atmósferas conteniendo altas concentraciones CO₂ y condiciones atmosféricas de O₂ (20 % CO₂ + 20 % O₂ + 60 % N₂). Durante el pretratamiento la atmósfera interior se mantuvo en los niveles requeridos aplicando un flujo continuo (180 mL · min⁻¹ y humedad relativa del 85-90 %), estimando diariamente la concentración de O₂ y CO₂ usando un sistema automatizado de cromatografía de gases equipado con un detector de conductividad térmica Chrompack CP20033P y una columna Poraplot (Varian, EE.UU). Una vez finalizado el tratamiento gaseoso, los frutos se transfirieron a flujo continuo de aire humidificado bajo las mismas condiciones que los frutos control hasta el final del periodo de conservación.

1.3.- Preparación y toma de muestras

Inicialmente, y previamente a la separación de los frutos en lotes, se cogieron 6 chirimoyas al azar representando la muestra denominada “frutos recién recolectados”. Diariamente y por un periodo de 4 días, para los frutos mantenidos a 20 °C, y después de 3, 5, 9 y 14 días de conservación a 6 °C se seleccionaron 3 chirimoyas aleatoriamente.

Una vez pelados los frutos y eliminadas sus semillas, se congeló el mesocarpo (capa media de las tres que forma el pericarpio de los frutos) rápidamente por inmersión prolongada en N₂ líquido. Estas muestras se conservaron a -80 °C en un congelador ULT 1386-5 VUA (Revco, EE.UU) para posteriores análisis.

2.- Análisis fisicoquímicos

2.1.- Sólidos solubles totales

Para la cuantificación del contenido de sólidos solubles totales (SST) se utilizó un refractómetro digital Dbx30 (Atago, Japón) con corrección automática de temperatura a 20 °C. Fueron utilizadas muestras pulverizadas y homogeneizadas de mesocarpo libres de piel y semillas, expresándose el resultado como grados Brix ($1^{\circ}\text{Brix} = 8,82 \text{ g sólidos solubles} \cdot \text{L}^{-1}$) a 20 °C.

2.2.- Aislamiento y cuantificación de la materia seca

La obtención de materia seca a partir de muestras de tejido de mesocarpo de chirimoya se llevo a cabo mediante un proceso de liofilización. Una vez pulverizado el tejido congelado, 100 g de muestra fueron introducidos en un equipo de liofilización TM-210 (Telstar Thermovac, España) y deshidratados a una temperatura de -40 °C y una presión de 0,1 Pa. La materia seca obtenida se almacenó en tubos Falcon a -20 °C para posteriores análisis. El resultado fue expresado como la masa en g de las muestras tras la liofilización por 100 g de peso fresco.

3.- Extracción y cuantificación de almidón

3.1.- Aislamiento de almidón

El método utilizado para el aislamiento de almidón fue el descrito por Aparicio-Saguilán *et al.* (2006) con modificaciones. En un matraz erlenmeyer de 250 mL se lavaron 100 g de fragmentos congelados del mesocarpo de chirimoya con 100 mL de una solución reductora (20 mM bisulfito sódico y 10 mM ácido cítrico) durante 1 h. Después los fragmentos se trituraron en una licuadora a baja velocidad durante 5 min. La muestra se mantuvo en hielo a lo largo de todo el proceso. El homogeneizado obtenido se centrifugó en una centrifuga refrigerada RC-5B (Sorvall, EE.UU.) a 3000 x g durante 15 min a 4 °C, dejando macerar durante 2 min la fracción que contenía el líquido y los sólidos en suspensión. Esta solución fue devuelta tubo que contenía el precipitado y se procedió a una nueva centrifugación a 3000 x g durante 25 min a 4 °C para eliminar el material soluble y recuperar la fracción precipitada.

El precipitado fue resuspendido en 100 mL de agua ultrapura de grado Milli-Q (Milli-Q Gradient A-10, Millipore, EE.UU.) y filtrado a través de dos membranas con un tamaño de poro de 20 y 325 US mesh (850 y 45 µm) respectivamente. En cada membrana, el residuo se

resuspendió en 150 mL de agua, repitiéndose el proceso hasta obtener un filtrado claro, indicando que todo el almidón ha sido extraído. Los filtrados se centrifugaron a $10000 \times g$ durante 30 min a 4 °C, descartándose el sobrenadante. En el precipitado obtenido se observó la presencia de dos capas: la superior de aspecto gelatinoso y color marrón, y la inferior de color blanco. Ésta última, compuesta de almidón, se homogeneizó con 250 mL de una disolución acuosa de NaCl 0,1 M mezclada con tolueno (7:1 v/v) en agitación durante toda la noche a 4 °C. Tras la centrifugación de la suspensión anterior a $7000 \times g$ durante 30 min a 4 °C se descartó la fase orgánica (superior), formada por proteínas, grasa y pequeños gránulos de almidón. A continuación se lavó repetidas veces la fase acuosa con fracciones de 100 mL de la mezcla de NaCl y tolueno. Finalmente, el almidón presente en la fase acuosa fue secado en un horno de convección DOD-90 (Raypa, España) a 35 °C durante 24 h, molido cuidadosamente en un mortero y almacenado a temperatura ambiente (25 °C) en tubos Falcon.

3.2.- Determinación de almidón por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se estableció un ensayo de cuantificación del almidón mediante el análisis térmico de la materia seca y del almidón del mesocarpo de chirimoya en presencia de exceso de agua. Los experimentos se desarrollaron en un calorímetro diferencial de barrido DSC822e (Mettler-Toledo, EE.UU.) equipado con un accesorio de enfriamiento por nitrógeno líquido y calibrado con indio y n-octano, tomando un crisol vacío de aluminio como referencia. Tanto el almidón purificado (10 mg) como la materia seca (15 mg) fueron pesados en una microbalanza EQ-163-FQG (Boeco, Alemania) en crisoles de aluminio de 100 μ L. A continuación se añadió agua ultrapura con el fin de establecer suspensiones con el grado de humedad adecuado (60, 70 y 80 %) para obtener un almidón completamente gelatinizado. Inmediatamente, los crisoles se sellaron herméticamente y se equilibraron durante 3 h a temperatura ambiente antes de ser introducidos en el DSC. Los crisoles se calentaron desde 25 °C hasta 110 °C a una velocidad de $10 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. A partir de los termogramas obtenidos se midió el valor de la entalpía (ΔH) y la temperatura de pico (T_p) de la endoterma de gelatinización. La integración de esta transición de fase se realizó en el mismo rango de temperaturas para la materia seca y el almidón purificado. Se determinó el contenido de almidón mediante la relación entre la entalpía de la materia seca y la entalpía del almidón purificado, expresando el resultado en mg de almidón por g de materia seca.

4.- Evaluación de la ultraestructura mediante LT-SEM

Las observaciones microscópicas de los tejidos del mesocarpo de la chirimoya fueron llevadas a cabo con un microscopio electrónico de barrido Zeiss DSN-960 equipado con un sistema de bajas temperaturas Cryotrans CT-1500-HF (Oxford Instruments, Reino Unido). Las muestras congeladas de los frutos fueron introducidas en el Cryotrans del microscopio, fragmentadas y fijadas sobre un soporte de cobre con un adhesivo de carbón coloidal. El proceso de fragmentación se efectuó a bajas temperaturas (criofracturación) con el objeto de revelar

características internas de la estructura celular. Tras esto, los soportes metálicos se introdujeron en el microscopio y se liofilizaron durante 2 min a $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $1,33 \cdot 10^{-5}$ Pa. Las muestras se cubrieron con una película de oro de 10 nm antes de llevar a cabo las observaciones a bajas temperaturas ($-160\text{ }^{\circ}\text{C}$), utilizando un haz de electrones de 5-10 kV. Las imágenes topográficas se obtuvieron mediante los electrones secundarios y retrodispersados producidos por las muestras tras interactuar con el haz de electrones primario, seleccionando aquellas con mejor resolución en cada caso.

5.- Extracción y determinación de solutos osmoprotectores

5.1.- Aminoácidos libres

La extracción de los aminoácidos se realizó mezclando 2 g de mesocarpo congelado de chirimoya con 5 mL de ácido perclórico 5 % (v/v) en un mortero enfriado con hielo. Tras homogeneizar la muestra durante 1 h, la mezcla se centrifugó a $27000 \times g$ durante 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante obtenido se filtró a través de un filtro de polietersulfona de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ (Millipore, EE.UU.) antes de ser inyectada una alícuota al analizador de aminoácidos Biochrom 20 (Amersham Biosciences, Suecia). En la cuantificación de prolina se hizo necesaria su separación del resto de aminoácidos mediante una cromatografía de intercambio catiónico y una derivatización post-columna con ninhidrina. La identificación de los aminoácidos en los cromatogramas se realizó comparando su tiempo de retención con un patrón comercial de estos compuestos (Sigma, EE.UU.). La cuantificación se llevó a cabo tras comparar el área relativa del pico de la muestra con la del patrón comercial, expresando los resultados como μmoles de aminoácido por g de peso fresco.

5.2.- Azúcares solubles

El análisis de los azúcares solubles se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), mediante extracción con etanol, siguiendo el método descrito por Rupérez y Toledano (2003). Para ello, 0,3 g de mesocarpo de chirimoya liofilizado se homogeneizaron en 30 mL de etanol 85 % (v/v). El homogenizado se incubó en un baño térmico en agitación a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h, enfriándose a temperatura ambiente y siendo centrifugado a $2500 \times g$ durante 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, y tomando alícuotas de 10 mL del sobrenadante, se evaporó el etanol usando un rotavapor R-3000 (Büchi, Alemania) a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se resuspendió el residuo sólido obtenido en 1,5 mL de agua ultrapura. Las muestras se filtraron a través de un filtro de acetato de celulosa de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ antes de su análisis cromatográfico. Los extractos ($20\text{--}40\text{ }\mu\text{L}$) se inyectaron a una columna polimérica de intercambio catiónico enlazado de $8\text{ }\mu\text{m}$ ($7,8 \times 300\text{ mm}$, CarboSep Coregel 87N, Transgenomic, EE.UU.) provista de una precolumna ($24 \times 4\text{ mm}$, CarboSep Coregel 87N, Transgenomic, EE.UU.) y termostatizadas a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$. La separación de los azúcares solubles se llevó a cabo con un gradiente isocrático de agua ultrapura a una velocidad de flujo de $0,6\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ en un cromatógrafo líquido 322 System (Kontron, Alemania) con inyector automático

Autosampler 565 (BioTek, EE.UU.) equipado con un detector de índice de refracción Smartline 2300 (Knauer, Alemania). La identificación de los compuestos se realizó por comparación con los tiempos de retención de los carbohidratos patrón (glucosa, fructosa, sacarosa, rafinosa y manitol; Sigma, EE.UU.). La cuantificación de los azúcares solubles se realizó obteniendo las ecuaciones de regresión de las curvas de calibración construidas para cada uno de los azúcares patrón comercial. Los resultados fueron expresados en mg de cada uno de los azúcares identificados por 100 g de materia seca.

5.3.- Glicina betaína

La glicina betaína fue aislada siguiendo el método descrito previamente por Hitz y Hanson (1980). Un gramo de tejido de mesocarpo congelado y pulverizado se mezcló con 10 mL de metanol frío en tubos de polipropileno de 50 mL, dejando homogeneizar la muestra en agitación y hielo durante 30 min. Se añadió al extracto 5 mL de cloroformo y 6 mL de agua ultrapura, agitando la mezcla. La fase acuosa se recogió y llevó a sequedad con una corriente de nitrógeno gas a temperatura ambiente en un concentrador DB3A (Techne, EE.UU.). Antes de pasar el extracto a través de las distintas columnas de intercambio iónico, éste se resuspendió en 2 mL de agua ultrapura y filtrado a través de filtros de celulosa de 0,45 μm . Primero se aplicó la disolución sobre una columna de resina Dowex 1X8- OH^- (Sigma, EE.UU) de 1x2 cm, eluyendo la glicina betaína con 6 mL de agua ultrapura. A continuación se introdujo el eluido acuoso en otra columna de resina Dowex 50W-X8- H^+ (Sigma, EE.UU), lavando la columna con 8 mL de agua ultrapura y eluyendo la glicina betaína con 6 mL de NH_4OH 6M. Finalmente, la mezcla resultante se concentró a sequedad con una corriente de N_2 a 70 °C. La determinación de glicina betaína se llevó a cabo tal como describen Storey y Wyn-Jones (1977). El extracto seco se disolvió en 100 μL de agua ultrapura, añadiendo entonces una alícuota de 100 μL de KI_3 ácido (7,5 g de I_2 y 10 g KI disueltos en 100 mL de HCl 1 N). Después de incubar la mezcla en hielo y en agitación durante 75 min, una alícuota de 2 mL de agua ultrapura y otra de 5 mL de 1,2-dicloroetano (Sigma, EE.UU) fue añadida en una campana de extracción de gases, habiendo almacenado previamente ambos reactivos a 4 °C. A continuación se agitó con cuidado y se esperó a que se separaran las fases, retirando la fase orgánica (capa inferior) y conservándola protegida de la luz a 4 °C. Se midió la absorbancia a 365 nm de la fase orgánica frente a un blanco, preparado de la misma forma que el extracto seco pero sustituyéndolo por agua ultrapura. La concentración de glicina betaína, formulada como μg por g peso fresco, se calculó por extrapolación de las absorbancias obtenidas frente a una curva patrón de glicina betaína comercial (Sigma, EE.UU).

5.4.- Poliaminas libres

5.4.1.- Extracción y derivatización de las poliaminas libres

La extracción de poliaminas totales del mesocarpo de la chirimoya se llevó a cabo macerando 2 g de tejido congelado en 5 mL de disolución de extracción conteniendo ácido perclórico 5 % (v/v) y 250 nmoles del patrón interno 1,6-hexanodiamina (HD; Sigma, EEUU). El homogeneizado fue almacenado en tubos de plástico durante 12 h a 4 °C en oscuridad, siendo posteriormente centrifugado a 27000 x g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se almacenó a -20 °C para su posterior dansilación. Para este proceso, las poliaminas libres se derivatizaron con cloruro de dansilo (CIDns) según el método descrito por Escribano y Legaz (1988). A 100 µL del extracto acuoso depositados en viales topacio se añadieron 200 µL de una disolución de Na₂CO₃ saturado y 400 µL de CIDns (20 mg · mL⁻¹ en acetona grado HPLC, preparada en el momento de su utilización y en oscuridad). Tras fuerte agitación, los viales topacio cerrados se almacenaron en oscuridad durante 16-18 h a temperatura ambiente. Con el fin de eliminar el exceso de CIDns, 100 µL de prolina (100 mg mL⁻¹ en agua ultrapura) se añadieron a la mezcla, agitándola y dejándola reposar durante 30 min. Las poliaminas dansiladas fueron extraídas con dos fracciones de 750 µL de tolueno (grado HPLC), secando la fase orgánica con una corriente de N₂ a temperatura ambiente y almacenando el residuo en viales topacio a -20 °C. Las poliaminas dansiladas almacenadas en estas condiciones y en oscuridad no mostraron variación alguna en su estabilidad química durante más de un mes.

5.4.2.- Identificación y cuantificación de las poliaminas libres

La identificación y cuantificación de las poliaminas dansiladas libres se llevó a cabo por HPLC siguiendo el protocolo descrito por Escribano y Merodio (1994). Previo a su análisis, los residuos se resuspendieron en 1 mL de metanol (grado HPLC). Los extractos (20-40 µL) se inyectaron a una columna de fase reversa C₁₈ 5 µm (4,6 x 150 mm; Kromasil, Suecia) a una temperatura de columna de 40 °C unida a un cromatógrafo líquido 322 System (Kontron, Alemania) con inyector automático Autosampler 565 (Kontron, Alemania). Se aplicó un gradiente lineal desde 55 % hasta 95 % (v/v) de metanol en 25 min, manteniéndose esta última composición hasta los 30 min y con un flujo constante de 0,9 mL · min⁻¹. Las poliaminas dansiladas separadas se detectaron en el espectrofotómetro de fluorescencia SFM 25 (Kontron, Alemania) a una longitud de onda de excitación de 350 nm y una longitud de onda de emisión de 495 nm. La identificación de las poliaminas endógenas se determinó por los tiempos de retención y la co-inyección de poliaminas patrón. La cuantificación de poliaminas se realizó mediante el procedimiento de calibración relativa descrito por Smith y Davies (1985). Para ello se obtuvieron las ecuaciones de regresión de las curvas de calibración relativa (nmol de cada poliamina por nmol de HD con respecto a las áreas relativas de cada pico de poliamina frente al área relativa del pico de HD) para putrescina, espermidina y espermina (Sigma, EEUU). Los valores se representaron como nmol de cada una de las poliaminas por g de peso fresco. Este método de cuantificación eliminó la variabilidad debida a los cambios de volumen y evitó los problemas relacionados con los cambios en la respuesta del detector, ya que la relación de áreas es constante.

6.- Determinación del patrón de isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa

Como paso previo a la purificación, se procedió a la obtención del patrón de inducción de isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa en mesocarpo de chirimoya, tratados o no con altas concentraciones de CO₂, a lo largo de su conservación a 6 y madurando a 20 °C. Para ello se diseñó un protocolo que permitió la obtención de fracciones separadas en función de su pI y enriquecidas en estas proteínas hidrolíticas.

6.1.- Extracción y precipitación de las proteínas

6.1.1.- Homogenización y eliminación de hidrocoloides

Se utilizaron muestras de mesocarpo congelado de chirimoya para la obtención de un extracto crudo clarificado. Se homogeneizaron 15 g de tejido en tampón de extracción, en una relación 1:1,5 (p/v), utilizando un Omnimixer 17106 (Sorvall, EE.UU.), a 1000 rpm durante 1 h. El tampón de extracción utilizado fue acetato sódico 100 mM, pH 5,0 que contenía además 1,5 % (w/v) PVPP, 10 mM EDTA y 20 mM ácido ascórbico. La muestra se mantuvo en hielo durante todo el proceso. El homogeneizado obtenido se centrifugó dos veces a 35000 x g durante 30 min a 4 °C para eliminar el material insoluble y las partículas en suspensión. El sobrenadante resultante se filtró utilizando el sistema de ultrafiltración Amicon Diaflo 80200 (Millipore, EE.UU.) con una membrana Biomax PBHK con un poro de corte de 100000 MW (Millipore, EE.UU.). Los carbohidratos poliméricos, especialmente sustancias pécticas y almidón, y otras moléculas de gran tamaño quedaron así retenidas en la parte superior mientras que las proteínas de interés se recuperaron en la fracción filtrada. El material retenido se lavó con dos fracciones de tampón tricina 50 mM, pH 8,0 antes de concentrar la fracción filtrada diez veces en el mismo equipo de ultrafiltración, utilizando para ello una membrana YM-10 con un tamaño de poro de 10000 MW (Millipore, EE.UU.).

6.1.2.- Precipitación con sulfato amónico

El extracto crudo fue sometido a un fraccionamiento por precipitación de proteínas mediante la adición de sucesivas cantidades de sulfato amónico. La sal se molió previamente hasta conseguir un fino polvo con el fin de minimizar la precipitación prematura de proteínas en el entorno de los cristales de sal añadida. El extracto se agitó en baño de hielo durante la lenta adición de las cantidades de sal necesarias para alcanzar cada uno de los porcentajes de saturación deseados. La velocidad de agitación fue suficiente para garantizar una rápida disolución de la sal, pero no tan alta como para provocar la desnaturalización y consecuente formación de espuma. La separación de las proteínas precipitadas se consiguió en dos pasos consecutivos de adición de sulfato amónico. Primero se añadió sal a la solución hasta un 20 % de saturación, centrifugándose después a 12000 x g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue llevado a un 85 % de saturación de (NH₄)₂SO₄, precipitando la mayoría de las proteínas de la muestra. Tras una centrifugación a 15000 x g durante 20 min a 4 °C se descartó el sobrenadante, redisolviendo el precipitado en 10 mL de tampón acetato sódico 100mM, pH 5,0 conteniendo glicerol al 10 %.

6.2.- Cromatografía de intercambio aniónico

La preparación enzimática obtenida en el paso anterior se concentró y desaló por ultrafiltración (membrana YM10), dejándola disuelta en tampón tricina 20 mM, pH 8,0 con glicerol al 10 %. La presencia de sulfato amónico se comprobó por reacción con cloruro de bario, el cual forma un precipitado blanco muy llamativo en presencia de cantidades mínimas de sulfato amónico. El extracto obtenido se fraccionó en una columna Mono-Q HR 5/5 (Amersham Biosciences, Suecia) de intercambio aniónico con un volumen de lecho de 1 mL e integrada en un sistema FPLC. El equipo cromatográfico estaba equipado de los siguientes módulos: dos bombas peristálticas P-500, un detector de luz ultravioleta UV-MII, una espiral de inyección de muestra de 2 mL, un recogedor de fracciones automático FRAC100 y un sistema de adquisición de datos LCC-501-Plus. Una vez equilibrada la columna con tampón tricina 20 mM, pH 8,0 conteniendo glicerol al 10 %, se aplicó la muestra en la columna, tras filtrarla a través de un filtro de PVDF de 0,22 μm . Ésta fue eluida utilizando el tampón de equilibrado con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1 M de 25 min y una velocidad de flujo de 1 mL \cdot min⁻¹. Se monitorizó la absorbancia del eluido a 280 nm, recogiendo fracciones de 5 mL en las que posteriormente se valoró la actividad quitinasa, por ensayo con CM-Chitin-RBV (Loewe Biochemica, Alemania), y la actividad 1,3- β -glucanasa, utilizando como sustrato laminarina (Sigma, EE.UU.). Las fracciones que presentaron actividad hidrolítica se reunieron, concentraron y disolvieron en 5 mL de tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0 conteniendo glicerol al 10 % mediante ultrafiltración (membrana YM10), denominándose fracción ácida. La fracción no adsorbida, o volumen muerto de la columna, se designó fracción básica. Ésta también se concentró y desaló por ultrafiltración en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0 conteniendo glicerol al 10 % con un sistema Centriplus YM3 (Millipore, EE.UU.). Ambas fracciones se almacenaron a -20 °C para posteriores análisis. El patrón de isoenzimas se obtuvo mediante la aplicación de las técnicas electroforéticas y de inmunodetección descrita en el apartado 9.

7.- Purificación de isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa

El aislamiento de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa que se expresan de forma diferencial en el mesocarpo de chirimoya se llevo a cabo mediante la aplicación de técnicas cromatográficas de afinidad e intercambio iónico. Se plantearon diversas estrategias de purificación que permitieron la obtención de cada una de las isoenzimas de interés con un significativo rendimiento. Todas ellas partían de las fracciones ácidas y básicas obtenidas siguiendo las indicaciones del apartado 6, presentado, por tanto, varias etapas de fraccionamiento comunes, tal como puede observarse en la Figura 9. Aunque en los apartado 4 de los *Resultados* se explica con mayor profundidad la dinámica de las purificaciones, brevemente indicar que se aislaron cinco isoenzimas quitinasa (AChi48, AChi26, AChi24, BChi33, BChi14) y una isoenzima 1,3- β -glucanasa (AGlu19). El material de partida fue el mesocarpo de chirimoyas conservadas 5 y 9 días a 6 °C y el procedente de frutos tratados con altas concentraciones de CO₂ y conservados 3 y 9 días a 6 °C

7.1.- Purificación de isoenzimas ácidas

7.1.1.- Cromatografía de afinidad en columna de quitina y cromatografía de intercambio aniónico

7.1.1.1.- Preparación de la columna de quitina

La fase estacionaria utilizada en la cromatografía de afinidad fue quitina regenerada, un sustrato sintético preparado mediante una reacción de reacetilación de quitosano (Sigma, EE.UU.). En un vaso de precipitados de 1 L se mezclaron lentamente 5 g de quitosano con 100 mL de ácido acético glacial 10 % (v/v), dejando la disolución, tapada y en oscuridad, reposar 24 h a temperatura ambiente. Una vez disuelto el polisacárido, se añadió en pequeñas fracciones 500 mL de metanol (grado HPLC). La mezcla turbia resultante fue filtrada en un embudo Büchner a vacío con lana de vidrio, añadiéndose 7,5 mL de anhídrido acético (Sigma, EE.UU.) al filtrado en agitación magnética. La polimerización se produjo de forma brusca tras unos minutos, formándose un gel transparente que se dejó reposar durante 30 min. Tras cortar el gel en pequeños fragmentos y eliminar el sobrenadante, la quitina regenerada se introdujo en el omnimixer y fue homogeneizada durante 1 min a 1000 rpm tras ser cubierta con metanol (grado HPLC). La fina dispersión resultante se filtró a través de una membrana de PVDF de 0,22 μm (Millipore, EE.UU.) en un sistema de filtración MF75 (Nalgene, EE.UU.), lavando el precipitado con agua ultrapura hasta alcanzar un pH neutro en el filtrado. La quitina seca se redisolvió en 250 mL de tampón MES 20 mM, pH 6,3, incorporando la mezcla a una columna de vidrio de 15 x 3 cm (424 cm^3). Antes de añadir la muestra, se equilibró y compactó de forma adecuada la fase estacionaria, evitando en todo lo posible la formación de burbujas. Por último se incorporó un disco de celulosa en la parte superior del lecho de la columna.

7.1.1.2.- Fraccionamiento cromatográfico

Una fracción ácida correspondiente a 250 g de mesocarpio de chirimoya se aplicó directamente a la columna de quitina regenerada. Una vez pasada toda la muestra, se cerró la columna, almacenándola durante 30 min a 10 °C. A continuación se lavó la columna con dos fracciones de 1 L de tampón de acetato sódico 20 mM, pH 5,5 en un régimen de flujo por gravedad, concentrando el volumen lavado por ultrafiltración (membrana YM10). Seguidamente se procedió a eluir las quitinasas con 4 volúmenes de 500 mL de NaCl 2M. La fracción recogida de la columna se concentró a un volumen de 5 mL por ultrafiltración, dejándola disuelta en tampón 20 mM, pH 8,0 con glicerol al 10%. La mezcla resultante fue finalmente purificada en la columna Mono-Q HR 5/5 siguiendo los mismos criterios mostrados en el apartado 6.2. Las fracciones que presentaron actividad enzimática quitinasa fueron examinadas mediante electroforesis e inmunoensayo con el fin de evaluar el grado de purificación de las isoenzimas obtenidas. Las isoenzimas purificadas (AChi24 y AChi48) se conservaron a -20 °C para posteriores análisis.

7.1.2.- Cromatografía de intercambio iónico por punto isoelectrico

7.1.2.1.- Aislamiento de proteínas en gradiente de pH 6-4

Tras obtener la fracción ácida pertinente de 150 g de tejido siguiendo las indicaciones del apartado 6 (Fig. 9), ésta se concentró y desaló por ultrafiltración (membrana YM10) en tampón BisTris-HCl 25 mM, pH 6.3 conteniendo glicerol al 10 %. La muestra filtrada a través de un filtro de PVDF de 0,22 μm se inyectó en una columna de cromatoenfoco Mono-P HR 5/20 (Amersham Biosciences, Suecia) con un volumen de lecho de 4 mL y equilibrada con el tampón en el que se encontraba disuelta la muestra. La elución se llevó a cabo con un gradiente isocrático de tampón Polybuffer 74-HCl (Amersham Biosciences, Suecia) 10 % (v/v), pH 4.0 de 49 min y una velocidad de flujo de 0,8 mL \cdot min⁻¹. En el eluido se midió la absorbancia a 280 nm, recogiendo fracciones de 1 mL y valorando su pH con un pHmetro MicropH-2000 (Crison, España). Se procedió a analizar la actividad enzimática quitinasa y 1,3- β -glucanasa, usando CM-Chitin-RBV y laminarina como sustrato respectivamente, de las fracciones eluidas así como la presencia de isoenzimas de estas enzimas mediante el uso de técnicas electroforéticas.

7.1.2.2.- Aislamiento de proteínas en gradiente de pH 5-4

Tras obtener un intervalo de fracciones con actividad quitinolítica siguiendo las instrucciones del apartado 7.1.2.1, éste se concentró y desaló por ultrafiltración en tampón piperazina-HCl 25 mM, pH 5.5 con glicerol al 10 %. El extracto filtrado se inyectó en la columna de cromatoenfoco Mono-P HR 5/20 equilibrada con el mismo tampón en el que se encuentra disuelta la muestra. Se aplicó un gradiente isocrático de tampón Polybuffer 74-HCl 10 % (v/v), pH 5.0 de 56 min a una velocidad de 0,8 mL \cdot min⁻¹. Las fracciones obtenidas se evaluaron por los criterios de actividad enzimática y análisis por electroforesis descritos en el apartado 7.1.1.2. La isoenzima purificada (AChi26) se conservó a -20 °C para posteriores análisis.

7.1.2.3.- Aislamiento de proteínas en gradiente de pH 6-5

Una vez concentrado y desalado en tampón BisTris-HCl 25 mM, pH 6.3 conteniendo glicerol al 10 %, un extracto de proteínas con actividad 1,3- β -glucanasa obtenido tal y como se describe en el apartado 7.1.2.1, se optó por la aplicación de un gradiente de pH entre 6 y 5. Para ello la muestra filtrada se inyectó en la columna de cromatoenfoco Mono-P HR 5/20 equilibrada con tampón BisTris-HCl 25 mM, pH 6.3 con glicerol al 10 %. Las proteínas retenidas en la columna se eluyeron con un gradiente isocrático de 26 min de tampón Polybuffer 74-HCl 10 % (v/v), pH 5.0 y una velocidad de flujo de 1 mL \cdot min⁻¹. La presencia de proteína en las diferentes fracciones eluidas de 1 mL se siguió mediante la medida de la absorbancia a 280 nm y se confirmó mediante técnicas electroforéticas y ensayos de actividad enzimática 1,3- β -glucanasa. La isoenzima purificada (AGlu19) se conservó a -20 °C para posteriores análisis.

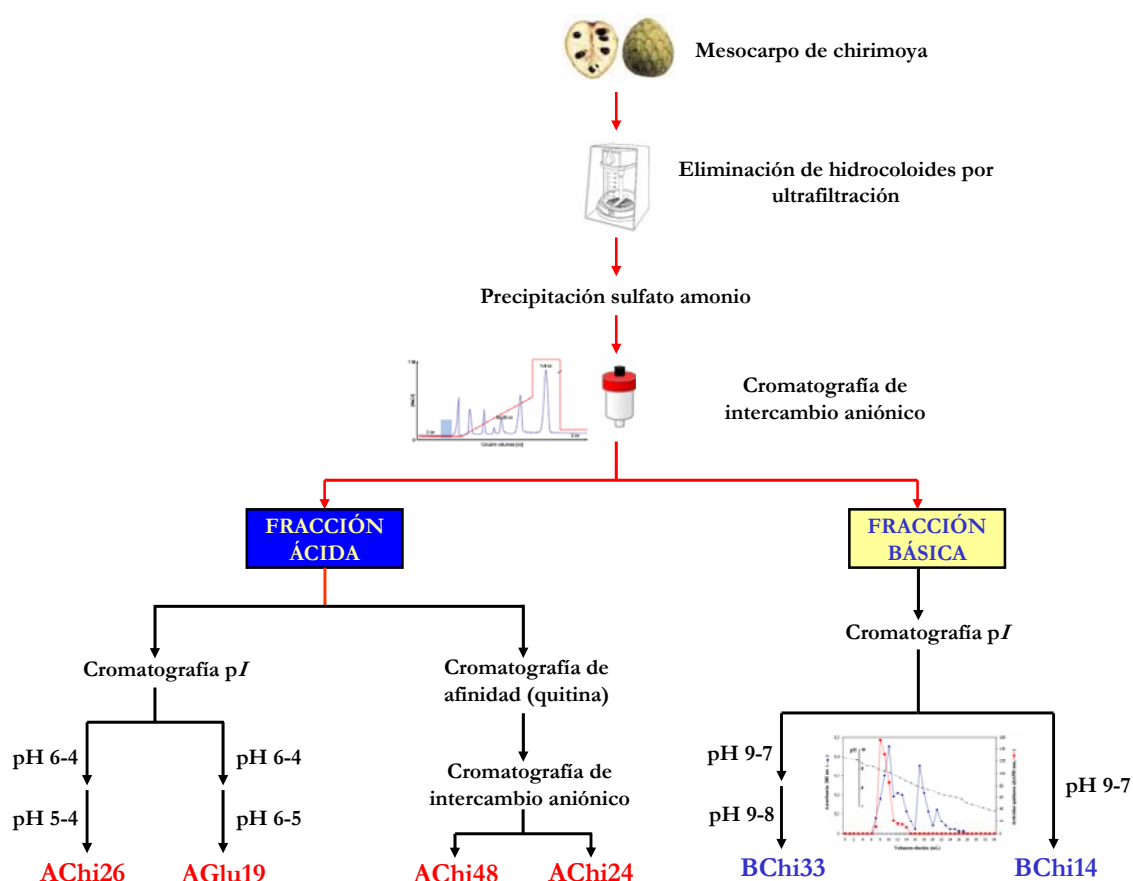


Figura 9. Esquema general del procedimiento de purificación de las isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa expresadas de forma diferencial en el mesocarpo de chirimoya.

7.2.- Purificación de isoenzimas básicas

7.2.1.- Cromatografía de intercambio iónico por punto isoelectrico

7.2.1.1.- Aislamiento de proteínas en gradiente de pH 9-7

Se estableció esta etapa en las purificaciones de las isoenzimas BChi33 y BChi14 a partir de fracciones básicas obtenidas de 150 y 250 g, respectivamente, del mesocarpo de chirimoya de acuerdo a las indicaciones del apartado 6. Los extractos resultantes se concentraron y desalaron por ultrafiltración (membrana YM10) en tampón dietanolamina-HCl 25 mM, pH 9,5 conteniendo glicerol al 10 %. Una vez equilibrada la columna de electroenfoque Mono-P HR 5/20 con el tampón anterior, se procedió a inyectar las muestras filtradas. La separación de proteínas se llevó a cabo mediante un gradiente isocrático de tampón Polybuffer 96-HCl (Amersham Biosciences, Suecia) 10 % (v/v), pH 7,0 de 43 min, con una velocidad de flujo de $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, recogiendo fracciones de 1 mL. Tras discriminar aquellas fracciones que presentaban absorbancia a 280 nm, se examinó la presencia de isoenzimas quitinasa mediante la determinación colorimétrica de su actividad enzimática y el análisis electroforético. La isoenzima purificada (BChi14) se conservó a -20°C para posteriores análisis.

7.2.1.2.- Aislamiento de proteínas en gradiente de pH 9-8

Las impurezas presentes en el conjunto de fracciones con actividad quitinasa obtenidas mediante el gradiente de pH anterior, se separaron de nuevo mediante otra etapa cromatográfica en un gradiente más estrecho. Las condiciones iniciales fueron las mismas que en el apartado 7.2.1.1, variando únicamente las características de elución. Se utilizó un gradiente isocrático de tampón Polybuffer 96-HCl 5,2 % (v/v) con Pharmalyte 8-10,5 (Amersham Biosciences, Suecia) 1 % (v/v), pH 8.0 de 38 min y una velocidad de flujo de $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Así mismo, se evaluó la presencia de isoenzimas quitinasa mediante la aplicación de los criterios mencionados en el apartado anterior. La isoenzima purificada (BChi33) se conservó a -20°C para posteriores análisis.

8.- Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína se estableció por diferentes métodos en función del grado de pureza y de la precisión requerida en cada caso. A lo largo de la purificación, la cantidad de proteína de las preparaciones se determinaba bien por la absorbancia a 280 nm, o bien por el método de Bradford. En aquellos casos que se requería una mayor sensibilidad, ya fuera por la dilución de la muestra o la escasez de ésta, se utilizó el método del ácido bicinónico (BCA).

8.1.- Absorbancia a 280 nm

La determinación de la cantidad de proteínas por este método se realizó midiendo la absorbancia de la muestra a 280 nm frente a un blanco que contenía el tampón en el que estaban disueltas las proteínas. La cuantificación se llevó a cabo mediante la preparación de una curva de calibrado con seroalbúmina bovina fracción V (BSA; Sigma, EE.UU.) en un rango que osciló entre $0,05$ y $2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. La aplicación de este rápido protocolo, de mediana exactitud, se realizó en operaciones rutinarias que no requerían la destrucción de la muestra como la detección post-columna.

8.2.- Método de Bradford

Siguiendo la metodología descrita por Bradford (1976), se cuantificó la cantidad de proteínas solubles utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, EE.UU.). En el ensayo se utilizaron $200 \mu\text{L}$ de reactivo, $100 \mu\text{L}$ de muestra (diluída, si fuera necesario, en agua ultrapura) y $700 \mu\text{L}$ de agua ultrapura. La mezcla se incubó durante 15-20 min a temperatura ambiente y se midió su absorbancia a 595 nm frente a un blanco que contenía los anteriores reactivos, pero sustituyendo la muestra por el tampón. La concentración de proteínas se determinó mediante la extrapolación a una curva de calibrado obtenida tras valorar concentraciones crecientes de BSA, desde 2 hasta $20 \mu\text{g}$ de proteína, proveniente de una solución madre de $0,1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

8.3.- Método del BCA

El principio de cuantificación de proteínas por este procedimiento es similar al descrito en el protocolo de Lowry *et al.* (1951), en el cual los iones Cu^{+2} son reducidos a Cu^+ por las proteínas en un medio alcalino. El complejo formado entre el BCA y los iones cuprosos se puede cuantificar a 562 nm y es proporcional a la concentración de proteínas en la muestra. Para la preparación del reactivo se utilizó el *kit* de ensayo de BCA (Sigma, EE.UU.), mezclando 50 volúmenes del reactivo A (BCA en tampón alcalino) con 1 volumen del reactivo B (solución 4 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Una vez enrasada la muestra a 500 μL con agua ultrapura se añadieron 500 μL del reactivo BCA, dejando incubar la mezcla a 37 °C durante 30 min en agitación. A continuación se midió la absorbancia a 562 nm frente a un blanco que contenía el tampón de la muestra, no dilatando la medida más de 10 min entre las muestras para evitar la aparición de errores significativos. Las lecturas obtenidas se transformaron en concentraciones de proteínas mediante una curva de calibrado construida con cantidades crecientes de BSA (0,5 a 15 μg de proteína).

9.- Técnicas electroforéticas e inmunológicas

9.1.- Electroforesis SDS-PAGE

La separación de las proteínas en función de su masa molecular se realizó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante en un sistema discontinuo comúnmente conocido como SDS-PAGE siguiendo el protocolo de Laemmli (1970).

9.1.1- Soluciones y tampones

- *Solución de acrilamida:* Acrilamida al 29,4 % (p/v) y 0,8 % (p/v) de $\text{N,N}'$ -metilenbisacrilamida (Sigma, EE.UU.) disueltos en agua ultrapura y filtrados a través de un filtro de PVDF de 0,45 μm .
- *Tampón de electroforesis:* 25 mM Tris-Base, 192 mM glicina, pH 8,3, 0,1 % (p/v) SDS.
- *Tampón de carga 2x:* 62,5 mM Tris-HCl, 20% (p/v) glicerol, 2 % (p/v) SDS, 0,05 % (p/v) azul de bromofenol. En el caso de desarrollar la electroforesis en un medio reductor, se añadió al tampón β -mercaptoetanol al 10 % (v/v).

9.1.2- Geles

Los geles formados por un gel de concentración en la parte superior y un gel de separación en la inferior, se prepararon en un sistema vertical Mini-Protean II (Bio-Rad, EE.UU.). Una vez preparada y desgasificada la mezcla del gel de separación (Tabla 3), se vertió entre los cristales del soporte hasta una altura de 5,5 cm, cubriéndola con un pequeño volumen de alcohol isopropílico. La polimerización tuvo lugar entre 30 y 40 minutos después, momento en el que se eliminó exhaustivamente el alcohol. Seguidamente se añadió la mezcla del gel de concentración y se incorporó el peine que formó los pocillos, evitando la formación de burbujas

de aire. Una vez polimerizado, se eliminó el exceso de gel de los pocillos y se cubrió el sistema con tampón de electroforesis.

9.1.3.- Preparación de las muestras y condiciones de electroforesis

Las muestras, con una cantidad de proteínas que oscilaba entre 1 y 20 μg , fueron mezcladas con tampón de carga 2x (1:1) y calentadas a 65 °C durante 20 min en agitación. Las mezclas resultantes fueron cargadas en el gel de electroforesis, utilizando un marcador preteñido de baja masa molecular (Bio-Rad, EE.UU.) como referencia, y se aplicó un campo eléctrico de 150 V durante 75 min.

Tabla 3. Composición de geles de acrilamida para un volumen total de 10 mL

Reactivo	Gel concentración (6 %)	Gel separación (13,5 %)
Solución monómeros acrilamida	1 mL	4,49 mL
Agua ultrapura	2,67 mL	2,85 mL
1.5 M Tris-HCl, pH 8,8	-	2,5 mL
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,26 mL	-
10 % (p/v) SDS	50 μL	100 μL
10 % (p/v) persulfato de amonio	45 μL	65 μL
TEMED	10 μL	12,5 μL

9.1.4.- Tinción de los geles

9.1.4.1.- Tinción con azul de Coomassie

Los geles provenientes de SDS-PAGE, se depositaron en cubetas de vidrio y se cubrieron con la solución de tinción (40 % metanol, 10 % ácido acético glacial, 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R-250; Sigma, EE.UU.) durante 2 h en agitación a temperatura ambiente. A continuación, se retiró dicha solución y se añadió la solución de destañido (40 % metanol, 10 % ácido acético glacial), manteniéndose hasta que las bandas correspondientes a las proteínas se visualizasen claramente.

9.1.4.2.- Tinción con sales de plata

La tinción con sales de plata es uno de los métodos más sensibles en la detección de proteínas separados por geles de poliacrilamida, con un umbral de detección de 0,1 $\text{ng} \cdot \text{mm}^2$ y entre 10 y 50 veces más que la tinción con azul de Coomassie. Los geles depositados en cubetas de vidrio se cubrieron durante 4 h en agitación a temperatura ambiente con la solución de fijado (40 % metanol, 10 % ácido acético glacial). A continuación los geles se sumergieron dos veces durante 30 min en etanol 30 %, se lavaron dos veces con agua ultrapura y posteriormente se

metieron en una solución oxidante ácida (34 mM $K_2Cr_2O_7$ en 32 mM ácido nítrico) durante 5 min. Los geles fueron lavados con agua ultrapura hasta que fueron incoloros. Posteriormente, se incubaron 40 min en oscuridad con la solución de nitrato de plata 0,1 % (w/v), realizándose a continuación dos lavados con agua ultrapura para eliminar el exceso de sales. Para el revelado del gel, se sumergieron los geles en una solución que contenía carbonato sódico 2,5 % (w/v) y formaldehído 0,02 % (v/v). En este paso las diferentes especies proteicas presentes en el gel adquirieron una coloración negra. Un último paso consistió en añadir una solución de ácido acético glacial 5 % (v/v) durante 5 min para detener el proceso de revelado.

9.2.- Inmunodetección en membrana de PVDF (*Western blotting*)

9.2.1- Soluciones y tampones

- *Tampón de transferencia*: 25 mM Tris-Base, 192 mM glicina, pH 8,3, 20 % (v/v) metanol.
- *Solución de lavado*: Tampón TBS-t (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % [v/v] Tween 20).
- *Solución de bloqueo*: Leche desnatada en polvo (Nestlé, España) al 5 % (p/v) en tampón TBS-t.
- *Solución del primer anticuerpo*: Anticuerpos policlonales relacionados con proteínas PR-Q (dilución 1:7000) y PR-2 (dilución 1:5000) de tabaco proporcionados por el Dr. B. Fritig (Estrasburgo, Francia) y disueltos en tampón TBS-t con 1 % (p/v) de BSA y 0,05 % (p/v) de azida sódica.
- *Solución del segundo anticuerpo*: Anticuerpo frente a IgG de conejo unido covalentemente a una enzima peroxidasa de remolacha (Amersham Biosciences, Suecia) disuelto en una proporción 1:5000 en TBS-t con 1 % (p/v) de BSA.

9.2.2.- Transferencia por método húmedo

Se utilizó un sistema de transferencia Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, EE.UU.) de acuerdo a la metodología descrita por Towbin *et al.* (1979). Se realizó en un recipiente con tampón de transferencia y se colocó sobre la placa del cátodo una esponja, 3 capas de papel de filtro Whatman 3MM, el gel de poliacrilamida, una membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham Biosciences, Suecia), otras tres capas de papel y otra esponja. Todos los componentes anteriores fueron previamente empapados en tampón de transferencia durante 15 min. La membrana se trató previamente durante 30 s en metanol y fue lavada en agua ultrapura, antes de ser equilibrada en tampón. La transferencia se realizó a 45 V a 4 °C durante toda la noche.

9.2.3.- Inmunodetección mediante anticuerpos conjugados a enzima peroxidasa

La membrana a la que fueron transferidas las proteínas se incubó en la solución de bloqueo durante 3 h a temperatura ambiente y en agitación. Tras lavar la membrana dos veces durante 5 min con solución de lavado, ésta fue incubada con el anticuerpo primario adecuado

(anti PR-Q para isoenzimas quitinasa y anti-PR2 para isoenzimas 1,3- β -glucanasa) durante 1 h. Seguidamente se lavó tres veces con solución de lavado, durante 10 min cada vez. A continuación se añadió el anticuerpo secundario, manteniendo la incubación durante otra hora. Posteriormente se lavó la membrana del mismo modo que el utilizado tras el anticuerpo primario. A la membrana, sobre un plástico transparente, se añadió 5 mL del reactivo de detección ECL (Amersham Biosciences, Suecia), y se dejó incubar durante 1 min. Tras eliminar el exceso de reactivo de la membrana, se envolvió con el plástico, se introdujo en un casete de autorradiografía (Amersham Biosciences, Suecia) y se cubrió con un fragmento de film Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Suecia). El tiempo de exposición al film osciló entre 1 y 3 min, revelando en ese momento la película. Se determinó la cantidad del complejo antígeno-anticuerpo en el film mediante el escaneo de éste y su cuantificación mediante un programa informático adecuado (apartado 17).

9.3.- Detección de glicoproteínas

La determinación de la presencia de glicoproteínas entre las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa de mesocarpio de chirimoya se llevó a cabo en una membrana de PVDF a la que fueron transferidas las proteínas separadas en un gel SDS-PAGE (apartados 9.1 y 9.2). El sistema de detección está basado en el protocolo de tinción PAS (*periodic acid-Schiff*) descrito por Zacharius *et al.* (1969) y Jay *et al.* (1990). La membrana de PVDF se colocó en una cubeta de vidrio y se cubrió con la solución oxidante (ácido periódico) proporcionada en el *kit* de detección de glicoproteínas (Sigma, EE.UU.) durante 30 min en agitación a temperatura ambiente. Seguidamente la membrana se lavó dos veces con agua ultrapura durante 10 min. El proceso de tinción se realizó por inmersión de la membrana en la solución del reactivo de Schiff durante 2 h, momento en el que fueron visualizadas bandas de color magenta. Posteriormente la membrana se sumergió en la solución reductora (metabisulfito sódico) durante 1 h, y después se lavó varias veces con agua ultrapura. Por último, la membrana teñida fue almacenada en una solución de ácido acético glacial 5 % (v/v). Se utilizaron concentraciones conocidas de la enzima peroxidasa de rábano (Sigma, EE.UU.) como control positivo.

10.- Ensayos de actividad enzimática

10.1.- Ensayo de actividad quitinasa

Para el ensayo de actividad quitinasa se utilizó el método descrito por Wirth y Wolf (1990), basado en la precipitabilidad en un medio ácido del sustrato coloreado no degradado. La mezcla de reacción (800 μ L) contenía 70 μ L de muestra, 200 μ L de sustrato CM-Chitin-RBV 2 mg \cdot mL⁻¹ (Loewe Biochemica, Alemania) y 530 μ L de tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0. Tras 10 min de incubación en agitación a 37 °C, se paró la reacción con la adición de 200 μ L de HCl 1 N, almacenando en hielo los eppendorf durante 10 min. Las muestras fueron centrifugadas a 10000 x g durante 10 min en una centrifuga MC12V (Sorvall, EE.UU.) para precipitar la

fracción no degradada del sustrato. El sobrenadante fue diluido con agua ultrapura (1:1), midiendo su absorbancia a 550 nm frente a un blanco que contenía la muestra enzimática inactivada con HCl 1 N. Puesto que el perfil de actividad de esta enzima mostró un carácter curvilíneo, se optó por la preparación de series de diluciones de la muestra para obtener una función lineal. Se definió una unidad (U) de actividad quitinasa como el incremento de absorbancia a 550 nm por mmol y tras un minuto bajo las condiciones arriba mencionadas. En la enunciación de esta unidad tan inusual se siguieron las recomendaciones de la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (NC-IUB, 1981), según la cual: “Una unidad estándar (1 U) de actividad enzimática se define como la cantidad de ésta que cataliza la formación de 1 μmol de producto por minuto bajo unas condiciones definidas”. En el establecimiento de este ensayo se desconocía tanto la concentración final como el coeficiente de absorción ε de éstos a 550 nm. De acuerdo a la ley de Lambert-Beer:

$$A_{550} = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

donde A es la absorbancia a 550 nm, ε el coeficiente de absorción lineal milimolar de los productos hidrolizados y unidos al grupo CM ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), b la distancia de paso de la radiación (cm) y c la concentración de dichos productos (mM). Si adaptamos la definición de unidad de actividad enzimática al rango de mmol:

$$U = \frac{\text{mmol}}{\text{min}} = \frac{c \cdot V}{\text{min}} = \frac{\frac{A_{550}}{b \cdot \varepsilon} \cdot V}{\text{min}} = \frac{\frac{A_{550}}{\text{cm} \cdot \frac{1}{\text{cm} \cdot \text{mM}}} \cdot L}{\text{min}} = \frac{A_{550} \cdot \text{mM} \cdot L}{\text{min}} = \frac{A_{550} \cdot \text{mmol}}{\text{min}}$$

Así mismo, se estudió el efecto sinérgico en la actividad hidrolítica entre las diferentes isoenzima quitinasa ácidas purificadas en mesocarpio de chirimoya. Para ello se utilizó CM-Chitin-RBV como sustrato, incubándolo durante 30 min junto a la enzima o mezcla de éstas bajo las condiciones antes descritas, y parando la reacción en intervalos de 5 min para medir la tasa de hidrólisis. La cantidad de enzima utilizada fue de 2 ng, tanto en los ensayos en solitario como en aquellos con las diferentes mezclas binarias. Se determinó el grado o coeficiente de sinergismo mediante el calculo de la relación de la actividad hidrolítica de la mezcla entre la suma de las actividades de cada enzima actuando de forma individual.

10.2.- Ensayo de actividad 1,3- β -glucanasa

Para los ensayos de actividad 1,3- β -glucanasa se utilizó un método modificado a partir del desarrollado por Dygert *et al.* (1965) de determinación de azúcares reductores. Como sustrato se usó laminarina procedente de *Laminaria digitata* (Hudson) (Sigma, EE.UU.), un β -poliglucano con enlaces β -(1-3) y ramificaciones β -(1-6). El sustrato se preparó en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0 a 0,167 % (p/v), agitando suavemente y almacenando la mezcla a 4 °C. La mezcla de

reacción, en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0, contenía 300 μL de sustrato y 50 μL de muestra, se llevó a un volumen total de 500 μL . Las muestras se incubaron a 37 °C en agitación durante 6 h, deteniendo la reacción con la adición de 40 μL de NaOH 2 N y el almacenamiento de los eppendorf en hielo durante 10 min. Los azúcares reductores hidrolizados desde el sustrato fueron determinados al añadir a la mezcla 5 mL de reactivo A (4,0 g Na_2CO_3 , 1,6 g glicina y 45 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ disueltos en 100 mL de agua ultrapura) y 5 mL de reactivo B (0,12 % [p/v] neocuproino-HCl [Sigma, EE.UU.]), La solución resultante se hirvió durante 10 min, midiéndose la absorbancia a 450 nm de la mezcla tras su dilución con agua ultrapura hasta un volumen total de 25 mL. Se utilizaron dos tipos de controles para eliminar la influencia de los azúcares reductores endógenos: uno externo, cambiando la muestra de la mezcla de reacción por el tampón pertinente, y uno interno, que incorporó muestra inactivada con NaOH 2 N. El estudio de la relación entre los azúcares reductores liberados y el tiempo de incubación mostró que la velocidad de hidrólisis presentaba un perfil lineal durante más de 10 h. La cantidad de azúcares reductores liberados se estimó a partir de una curva de calibrado realizada con cantidades crecientes de glucosa (Sigma, EE.UU.), desde 2,5 a 125 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, disueltas en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0. Una unidad (U) de actividad 1,3- β -glucanasa fue establecida como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de glucosa por minuto en las condiciones descritas.

11.- Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de las isoenzimas purificadas

11.1.- pH óptimo

Se midió el pH óptimo de las diferentes isoenzimas tras establecer un ensayo de actividad enzimática en donde se incubó las isoenzimas siguiendo las condiciones estándar descritas en los apartados 10.1 y 10.2 y en un rango de pH que oscilaba entre 2,0 a 13,0. Los tampones de 100 mM utilizados fueron: ácido fosfórico pH 2,0; glicina-HCl pH 3,0; acetato sódico pH 4,0-6,0; fosfato sódico dibásico pH 6,5-7,0; Tris-HCl pH 9,0; glicina-NaOH pH 11,0-13,0.

11.2.- Estabilidad al pH

Para determinar la estabilidad frente al pH se incubaron cada una de las isoenzimas purificadas durante 2 h a 37 °C en el rango de pH y con los tampones antes indicados sin la presencia de sustrato. El cambio de tampón de las disoluciones enzimáticas fue efectuado por ultrafiltración en un dispositivo Centricon YM3 (Millipore, EE.UU.). Transcurrido este tiempo se llevó a cabo la reacción enzimática con el sustrato en las condiciones estándar establecidas en las secciones 10.1 y 10.2.

11.3.- Temperatura óptima

La temperatura óptima se determinó incubando cada enzima con el sustrato apropiado en un rango de temperaturas que varió entre 5 y 80 °C en las condiciones estándar establecidas en las secciones 10.1 y 10.2.

11.4.- Estabilidad a la temperatura

Las isoenzimas purificadas se incubaron en el mismo rango de temperaturas que el apartado anterior durante 2 h sin sustrato en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0. Las actividades residuales de las enzimas se determinaron en las condiciones estándar establecidas en los apartados 10.1 y 10.2. En los cuatro ensayos que estudiaron la influencia del pH y la temperatura se utilizaron cantidades de enzima que oscilaron entre 2 y 6 ng para las isoenzimas quitinasa y 50 ng para la isoenzima 1,3-β-glucanasa.

11.5.- Determinación de los parámetros termodinámicos de la reacción enzimática

La medida de la actividad específica en un rango de temperaturas definido de acuerdo a las especificaciones del apartado 11.3 de esta sección fue la base para el cálculo de la energía de activación (E_a) y de la variación de energía libre de Gibbs (ΔG^\ddagger) del complejo enzima-sustrato (ES) de las reacciones de hidrólisis de cada una de las isoenzimas purificadas. Para el cómputo del primer parámetro se optó por la determinación de la pendiente de la curva obtenida con la transformación lineal de la ecuación de Arrhenius (Arrhenius, 1889):

$$\log k_{cat} = \frac{-E_a}{2,3 \cdot R} \cdot \frac{1}{T} + \log A$$

donde R es la constante molar de los gases perfectos ($8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), T es la temperatura expresada en K, A es el factor pre-exponencial (relacionado con la frecuencia de colisión intermolecular) y k_{cat} es la constante catalítica de la reacción. Sin embargo, desde un punto de vista práctico, en reacciones catalizadas enzimáticamente se puede sustituir la constante catalítica por el parámetro de la actividad específica de la enzima purificada (A.E) de acuerdo a la conocida relación (Segel, 1993):

$$k_{cat} = A.E \cdot M_r(\text{enzima})$$

siendo M_r su masa molecular y k_{cat} el valor de su constante catalítica. En la determinación del otro parámetro termodinámico, se asumió la descripción de la teoría del estado de transición para una reacción enzimática. En ésta se asume la existencia de un equilibrio entre el estado activado del complejo enzima-sustrato (ES^\ddagger) y su estado basal (ES). La dependencia de la temperatura de la constante de velocidad de la reacción esta dada entonces por la relación:

$$k_{cat} = \frac{k_b \cdot T}{h} \cdot e^{-\Delta G^\ddagger / R \cdot T}$$

donde k_b es la constante de Boltzmann ($1,3805 \cdot 10^{-3} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$), h la constante de Planck ($6,6256 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$) y ΔG^\ddagger la energía libre de activación. Si asumimos una serie de simplificaciones para facilitar el cálculo de la ecuación anterior (como la no dependencia de las constantes termodinámicas con la temperatura), el valor de la ΔG^\ddagger (en $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$) a una temperatura fija equivale a:

$$\Delta G^\ddagger = R \cdot T \cdot (\ln \frac{k_b \cdot T}{h} - \ln k_{cat}) = R \cdot T \cdot (23,76 + \ln T - \ln k_{cat})$$

Por último, también se calcularon los otros dos parámetros termodinámicos de activación, tanto la entalpía (ΔH^\ddagger) como la entropía (ΔS^\ddagger), a partir de las ecuaciones anteriores:

$$\Delta H^\ddagger = E_a - R \cdot T$$

$$\Delta S^\ddagger = \frac{(\Delta H^\ddagger - \Delta G^\ddagger)}{T}$$

Por otro lado, resulta conveniente señalar que la utilización de estas ecuaciones contrasta con la metodología seguida por los primeros estudios en este campo, y en algunos de la bibliografía actual, donde de forma invariable se aplicaron otras ecuaciones en la determinación de estos parámetros termodinámicos (Lehrer y Barker, 1970; Low *et al.*, 1973):

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \cdot \Delta S^\ddagger$$

$$\Delta H^\ddagger = E_a - R \cdot T$$

$$\Delta S^\ddagger = R \cdot (\ln k_{cat} - 24,76 - \ln T + \frac{E_a}{R \cdot T})$$

Aunque estas ecuaciones son correctas, este cálculo de los parámetros termodinámicos es indirecto ya que implica determinar primero las ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger para obtener el valor de la ΔG^\ddagger y, por tanto, no tiene en cuenta que la ΔG^\ddagger está relacionado directamente con la k_{cat} . Esta especificación es importante para una correcta determinación de los errores de los parámetros termodinámicos de activación, ya que los errores asociados a la ΔG^\ddagger no dependen de las ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger , sólo del error en la k_{cat} :

$$(\Delta G^\ddagger)_{Err} = \frac{R \cdot T \cdot (k_{cat})_{Err}}{k_{cat}}$$

En base a este razonamiento, resulta más conveniente la utilización de las primeras ecuaciones citadas, tal y como han sugerido las últimas revisiones en el campo (Lonhienne *et al.*, 2000).

12.- Determinación de parámetros fisicoquímicos de las isoenzimas purificadas

12.1.- Determinación de la masa molecular

12.1.1.- Electroforesis SDS-PAGE

La masa molecular de las proteínas purificadas se determinó por electroforesis desnaturalizante con un porcentaje de acrilamida de 13,5 %, utilizando un patrón preteñido de proteínas de baja masa molecular: lisozima de huevo (18800 Da), inhibidor de tripsina de soja (28200 Da), anhidrasa carbónica bovina (37200 Da), ovoalbumina de huevo (52300 Da), seroalbúmina bovina (93600 Da) y fosforilasa B de músculo de conejo (106900 Da). Se construyó una curva de calibrado representando los valores del logaritmo de la masa molecular de cada proteína frente a sus movilidades electroforéticas relativas (R_f). De esta manera determinando por SDS-PAGE la R_f de las isoenzimas purificadas se pudo calcular su masa molecular. Este parámetro también fue calculado por medio de electroforesis SDS-PAGE en un medio reductor, añadiendo β -mercaptoetanol al tampón de carga 2x, con el objetivo de establecer la naturaleza mono u oligomérica de las enzimas aisladas.

12.1.2.- Espectrometría de masas (MALDI-TOF)

Con el objeto de confirmar la masa molecular de las seis isoenzimas purificadas en esta memoria de investigación (AChi48, AChi26, AChi24, BChi33, BChi14 y AGlu19), se procedió a determinar este parámetro mediante la utilización de una técnica de espectrometría de masas (EM) denominada MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight*). Para ello se utilizaron entre 10 y 15 μ g de las proteínas convenientemente desaladas por ultrafiltración en un volumen final de 40 μ L de agua ultrapura con un sistema Centriplus YM3 (Millipore, EE.UU.). Una fracción de 1 μ L del extracto se cargó en una placa MALDI y se dejó secar a temperatura ambiente. A continuación se añadió 0,4 μ L de matriz (3 mg \cdot mL⁻¹ ácido α -ciano-4-hidroxycinámico disuelto en 50 % (v/v) acetonitrilo y 0,5 % (v/v) TFA), y se dejó secar hasta que la mezcla de proteína y matriz adquirió una apariencia cristalina. Para la determinación exacta de la masa molecular se utilizó un espectrómetro de masas Voyager DE-STR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems, EE.UU.), trabajando en modo reflectrón positivo.

12.2.- Determinación del punto isoelectrico

Se utilizó la cromatografía por punto isoelectrico para determinar este parámetro de cada uno de las isoenzimas purificadas. En el caso de las isoenzimas quitinasa y de la isoenzima 1,3- β -glucanasa purificadas por esta técnica (secciones 7.1.2 y 7.2) el valor del pI fue elucidado a lo largo del aislamiento. En el caso de las proteínas purificadas con la columna de quitina, se preparó una disolución filtrada de 30 μ g de cada una de las enzimas en 2 mL de tampón piperazina-HCl 25 mM, pH 5,5 conteniendo glicerol al 10 % antes de ser cargadas en la columna Mono-P HR 5/20 equilibrada con el mismo tampón. La elución se realizó en un rango de pH que oscilaba entre 5 y 4 con un gradiente isocrático de 56 min de tampón Polybuffer 74-HCl 10 % (v/v), pH 4,0 y una velocidad de flujo de 0,8 mL \cdot min⁻¹. El punto isoelectrico se calculó tras

observar el cromatograma que registraba la absorbancia a 280 nm de las diferentes fracciones de 1 mL y medir su pH respectivo.

13.- Mecanismo de hidrólisis de las isoenzimas purificadas

13.1.- Isoenzimas quitinasa

Como se ha mencionado en la *Introducción*, la nomenclatura y clasificación de las quitinasas puede abordarse desde diferentes criterios, siendo uno de ellos su mecanismo de hidrólisis. En este sentido, la utilización de oligosacáridos sintéticos de NAG asociados a grupos con actividad fluorescente, como el 4-metilumbelliferil (4-MU), se ha revelado como una alternativa eficaz en su determinación (Carsolio *et al.* 1994; Donzell y Harman 2001; Omero *et al.* 2001). Las enzimas con actividad quitinolítica fueron detectadas utilizando tres sustratos muy sensibles que generan un producto fluorescente tras su hidrólisis enzimática (Tabla 4). Estos compuestos funcionan como monosacáridos, disacáridos o trisacáridos, en donde el grupo 4-MU se encuentra unido con un enlace β -(1-4) a los diferentes quito oligosacáridos o al amino azúcar NAG. Únicamente el compuesto 4-MU libre, hidrolizado de los oligosacáridos, presenta actividad fluorescente. Se prepararon soluciones madre de los sustratos 4-MU- β -GlcNAc, 4-MU- β -(GlcNAc)₂ y 4-MU- β -(GlcNAc)₃ con una concentración de 1 mM en tampón de reacción (acetato sódico 50 mM, pH 5,0). La hidrólisis de estos compuestos por parte de las diferentes isoenzimas quitinasa purificadas fue llevada a cabo tras su adición a una mezcla que contenía 0,75 mL de sustrato (con la concentración deseada) y 2,25 mL de tampón de reacción. Las mezclas de reacción fueron incubadas durante 30 min a 37 °C. La reacción se detuvo con 0,25 mL de tampón carbonato/bicarbonato sódico 1 M, pH 10,7.

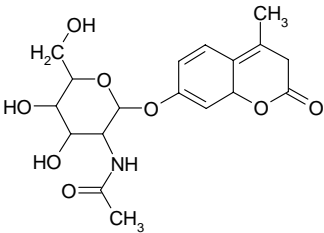
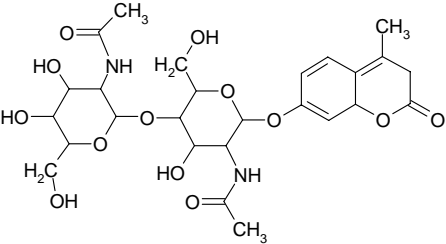
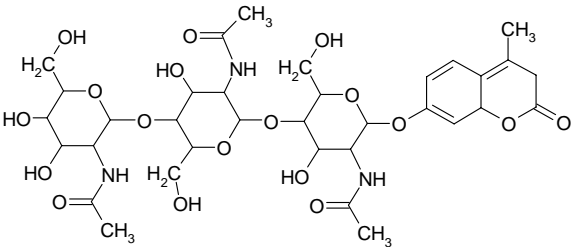

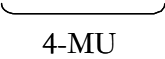
Posteriormente se midió su fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 355 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm frente a un blanco que contiene los anteriores reactivos sin la enzima. Los datos de intensidad de fluorescencia se tradujeron a concentraciones de 4-MU usando los parámetros de una curva de calibración construida previamente usando concentraciones crecientes, de 10 a 150 nM, de 4-MU disuelto en tampón carbonato/bicarbonato sódico 100 mM, pH 10,4.

13.2.- Isoenzimas 1,3- β -glucanasa

Para caracterizar el tipo de hidrólisis de este tipo de enzimas, se utilizaron dos sustratos. El primero fue laminarina oxidada con periodato potásico, el cual no es degradado por enzimas que presenten un mecanismo tipo exo-1,3- β -glucanasas y por tanto es el sustrato empleado en la identificación de endo-1,3- β -glucanasas (Goldstein *et al.* 1965). La síntesis del sustrato se realizó disolviendo 25 mg de laminarina procedente de *Laminaria digitata* en 5 mL de NaIO₄ 50 mM e incubando la mezcla durante 7 días a 4 °C en oscuridad. La reacción fue parada con 25 μ L de etilenglicol (Sigma, EE.UU.), dejando a continuación la laminarina oxidada disuelta en tampón

acetato sódico 100 mM, pH 5,0 con una concentración final de 0,167 % (p/v). El ensayo con este sustrato se hizo en las mismas condiciones que las reflejadas en el apartado 10.2., utilizando 50 ng de la enzima purificada.

Tabla 4. Oligosacáridos de NAG asociados a 4-MU utilizados como sustratos en la detección de enzimas quitinolítica

Estructura	Compuesto
	4-metilumbelliferil-N-acetil- β -D-glucosaminida
	4-metilumbelliferil-N-acetil- β -N'-N'-diacetilglucosamina
	4-metilumbelliferil-N-acetil- β -N'-N'-N''-triacetilglucosamina
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>(GlcNAc)_n</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>4-MU</p> </div> </div>	

El segundo fue *p*-nitrofenil- β -D-glucosido (PNPG; Sigma, EE.UU.), el cual es solo hidrolizado por exo-1,3- β -glucanasas. La actividad enzimática frente a este compuesto fue determinada siguiendo la metodología de Nebreda *et al.* (1986). El ensayo se efectuó incubando a 37 °C durante 6 h una mezcla de reacción que contuviera 0,25 % (p/v) del sustrato y 50 ng de la enzima en un volumen total de 0,5 mL de tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0. La reacción se paró con la adición de 200 μ L de Na₂CO₃ 0,2 M, midiendo la absorbancia a 410 nm frente a un blanco externo con el fin de cuantificar el *p*-nitrofenol liberado al medio. Se preparó una curva de calibrado con *p*-nitrofenol (Sigma, EE.UU.) disuelto en tampón glicina-NaOH 100 mM, pH 11,5 para 0, 20, 40, 60, 80 y 100 μ M. Una unidad (U) de actividad 1,3- β -glucanasa fue establecida

como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de *p*-nitrofenol por hora en las condiciones arriba descritas.

Por último se estudió el efecto del compuesto δ -gluconolactona, un eficaz inhibidor de ciertas exo-1,3- β -glucanasas y β -glucosidasas (Pitson *et al.* 1993), sobre la enzima aislada. Tanto las condiciones de reacción como el sustrato utilizado fueron las establecidas en el ensayo estándar, añadiendo concentraciones crecientes de δ -gluconolactona (Sigma, EE.UU.) a la mezcla de reacción en un intervalo que fluctuaba entre 0,5 y 30 mM.

14.- Caracterización cinética de las isoenzimas purificadas

El estudio cinético de las isoenzimas quitinasa se llevó a cabo a 37 °C y al pH óptimo de cada una de ellas, frente a CM-Chitin-RBV y los tres sustratos asociados al grupo fluoróforo 4-MU. Con respecto al primero, se incubaron entre 2 y 4 ng de enzima con concentraciones de sustrato que se encontraban en un rango entre 0,05 y 0,75 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de acuerdo a las especificaciones del apartado 10.1. En el caso de la hidrólisis de los oligosacáridos sintéticos de NAG, la concentración de sustrato osciló entre 0,05 y 0,6 mM, la cantidad de enzima utilizada fue de 0,2 ng y las condiciones de reacción fueron las descritas en el apartado 12.1. La enzima 1,3- β -glucanasa purificada se ensayó de acuerdo a las condiciones especificadas en el apartado 10.2, utilizando 25 ng de proteína purificada y un rango de concentraciones para el sustrato que oscilaba entre 0,1 a 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Los datos obtenidos se analizaron mediante el modelo cinético de Michaelis-Menten, determinándose el valor de la velocidad máxima (V_{max}) y la constante de Michaelis-Menten (K_m) según la representación de Hanes-Wolf.

En la determinación de las unidades de las constantes cinéticas de las enzimas quitinasa frente al sustrato polimérico CM-Chitin-RBV se utilizaron igualmente las recomendaciones de la NC-IUB (1981) y las equivalencias anteriormente deducidas entre la A_{550} y la concentración de los productos de hidrólisis. Teniendo en cuenta que la velocidad inicial de una reacción en el estado estacionario (v) se define como:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{d\left(\frac{A_{550}}{\varepsilon \cdot b}\right)}{dt} = \frac{d\left(\frac{A_{550}}{\frac{1}{\text{mM} \cdot \text{cm}} \cdot \text{cm}}\right)}{dt} = \frac{d(A_{550} \cdot \text{mM})}{dt}$$

donde [P] es la concentración de producto y t representa el tiempo de reacción. Para un intervalo de tiempo definido, la velocidad inicial de reacción puede ser determinada de la pendiente de la curva de variación de la absorbancia a frente al tiempo, con unas unidades de $\Delta A_{550} \cdot \text{mM} \cdot \text{min}^{-1}$.

15.- Identificación de las isoenzimas purificadas mediante técnicas proteómicas

La identificación de proteínas separadas en geles de poliacrilamida consta de varios pasos. Primero, las proteínas de los geles son digeridas *in situ* con tripsina. A continuación, los péptidos resultantes son analizados mediante la utilización de espectrometría de masas MALDI-TOF. Estos péptidos tripticos proporcionan un mapa de huella peptídica (PMF, *peptide mass fingerprint*) que puede ser utilizado en la identificación de la proteína tras cotejar los datos experimentales con los presentes en las bases de datos. Sin embargo, si el PMF de las proteínas no resultase suficiente, se hace necesaria entonces la obtención de los espectros de fragmentación de los péptidos individuales mediante la espectrometría de masas en tandem (EM/EM) en el modo MALDI-TOF/TOF, con objeto de obtener una identificación inequívoca mediante los datos de las secuencias de alguno de los péptidos de las proteínas (Figura 10).

15.1.- Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

El método utilizado para obtener las isoenzimas purificadas como bandas teñidas con azul de Coomassie en geles de poliacrilamida fue el descrito en el apartado 9.1 con algunas modificaciones. Puesto que el SDS no es un reactivo compatible con la espectrometría de masas tipo MALDI-TOF, éste compuesto fue eliminado de la mezcla de acrilamida por agua ultrapura. Sin embargo, no fue necesario modificar la composición del tampón de carga 2x, ya que la poca cantidad de detergente aportada a la muestra no implicaba ninguna interferencia importante. La cantidad de proteína cargada en el gel osciló entre 1 y 2 µg. Así mismo, la tinción se efectuó con azul de Coomassie coloidal G-250 (Sigma, EE.UU.), un procedimiento que aumenta la sensibilidad de tinción en más de 10 veces (Neuhoff *et al.* 1988). Para ello el gel se fijó en una solución de 40 % (v/v) metanol y 7 % (v/v) ácido acético glacial durante 30 min. Seguidamente, fue sumergido durante 3 h y en agitación en una solución de tinte que contenía azul de Coomassie coloidal G-250 diluido en metanol. Por último el gel se destiñó, primero con una solución de 25 % (v/v) metanol y 15 % (v/v) ácido acético durante 60 s y después con varios lavados de 30 min de una solución de 25 % (v/v) metanol. El resultado de la tinción mejoró ostensiblemente al lavar y almacenar el gel en agua ultrapura tras este último paso.

15.2.- Recuperación y digestión de las proteínas de los geles de poliacrilamida

Las bandas se recuperaron mediante la ayuda de cuchilla de escalpelo limpia, recortando de la manera más precisa posible y evitando tomar superficie de gel no teñido o que pueda corresponder a manchas adyacentes. Las proteínas seleccionadas para el análisis fueron reducidas, alquiladas y digeridas con tripsina de acuerdo a las indicaciones de Shevchenko (2001). El fragmento de gel se introdujo en un eppendorf y se lavó dos veces con agua ultrapura durante 10 min. La destinción completa se realizó por inmersión en una solución de 30 mM de ferrocianuro potásico y 100 mM de tiosulfato sódico durante otros 10 min. Una vez lavado el gel de solución de destiñido con agua ultrapura, se deshidrató lavándolo tres veces con acetonitrilo durante 15

min y se secó a vacío en una centrifuga Savant SpeedVac (Thermo Scientific, EE.UU.) durante 30 min. Las proteínas del gel se redujeron añadiendo tampón bicarbonato amónico 25 mM, pH 8,5, con 10 mM DTT[†] e incubando durante 30 min a 56 °C. Posteriormente, las cisteínas reducidas se carbamidometilaron incubando las muestras durante 20 min en oscuridad con tampón bicarbonato amónico 25 mM con 55 mM iodoacetamida. Los geles se lavaron una vez con tampón bicarbonato amónico 25 mM y se deshidrataron, de nuevo, lavándolos tres veces con acetonitrilo. Seguidamente, las muestras fueron digeridas añadiendo una solución de tripsina (Roche Molecular Biochemicals, Suiza) 12,5 ng μL^{-1} en tampón bicarbonato amónico 25 mM, en un volumen adecuado para que se rehidratara todo el gel, e incubando durante 45 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el gel se cubrió con tampón bicarbonato amónico 25 mM. La digestión de las proteínas se realizó a 30 °C durante al menos 6 h. La extracción de los péptidos de digestión se efectuó mediante tres lavados con una solución de 50 % (v/v) acetonitrilo, 0,5 % (v/v) TFA seguidos de otros tres lavados con acetonitrilo. Los sobrenadantes obtenidos con los extracciones anteriores fueron secados con la centrifuga Savant SpeedVac y resuspendidos en 5 mL de 50 % (v/v) acetonitrilo, 0,5 % (v/v) TFA.

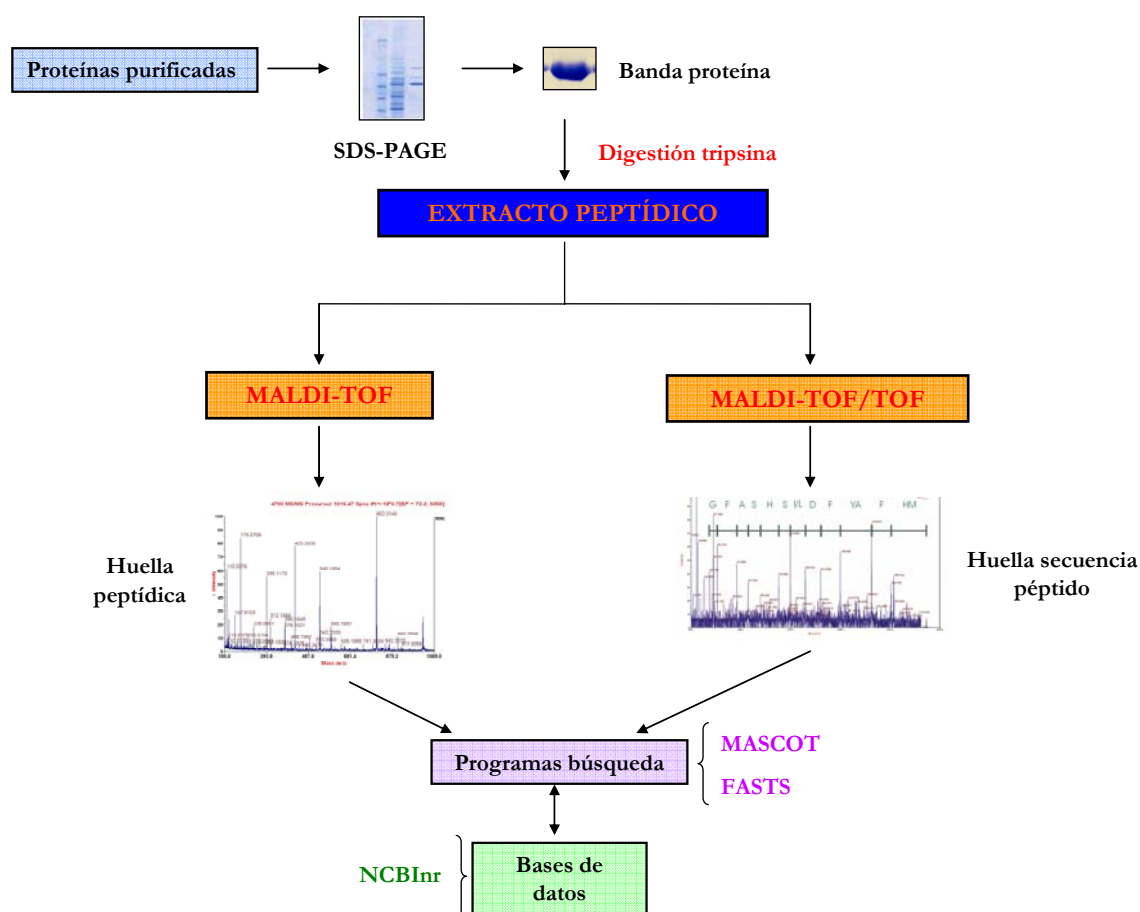


Figura 10. Esquema general del procedimiento de identificación de proteínas por espectrometría de masas tipo MALDI.

15.3.- Identificación de proteínas mediante huella peptídica

Una fracción de 1 μL del extracto se cargó en una placa MALDI y se dejó secar a temperatura ambiente. A continuación se añadió 0,4 μL de matriz (3 mg mL^{-1} ácido α -ciano-4-hidroxicinámico disuelto en 50 % (v/v) acetonitrilo y 0,5 % (v/v) TFA), y se dejó secar hasta que la mezcla de péptidos y matriz adquirió una apariencia cristalina. Para la identificación de las muestras mediante mapeo peptídico se utilizó un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4800 Plus Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, EE.UU.) Los análisis se realizaron en modo automático, trabajando en modo reflectrón positivo y promediando los espectros obtenidos a partir de 500 disparos por espectro en el rango de m/z de 750 a 4500. Los espectros se calibraron internamente utilizando los iones derivados de los péptidos de autodigestión de la tripsina ($[M + H]^+ = 842,5100; 1045,5642; 2011,1046; 2807,3145; 3337,7577 \text{ Da}$). Los criterios utilizados para la detección de los picos fueron; relación $S/N \leq 8$ y anchura de la ventana de ruido en la coordenada del parámetro masa/carga (m/z) de 200.

15.4.- Identificación de proteínas mediante secuenciación de péptidos

Como paso previo, las muestras se desalaron utilizando un ZipTip C-18 (Millipore, EE.UU.) siguiendo el siguiente protocolo: lavado y acondicionamiento de la microcolumna C_{18} con cinco cambios de una solución 50 % (v/v) acetonitrilo, 0,5 % (v/v) TFA; carga de la muestra en diez fracciones de 10 μL de las disoluciones digeridas; tres lavados con una solución 0,1 % (v/v) TFA y otros tres con agua ultrapura; y elución de los péptidos con 5 μL de 70 % (v/v) metanol, 1 % (v/v) ácido acético glacial. El eluido fue preparado para su análisis EM/EM del mismo modo que en el apartado anterior mediante el espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4800 Plus Proteomics Analyzer trabajando en modo reflectrón positivo. Una vez seleccionado el precursor adecuado con la información de la huella peptídica, se fragmentó activando el sistema de disociación inducida por colisión (CID). La energía de colisión fue de 1 keV y el gas utilizado aire atmosférico con una presión de $2\text{--}3 \cdot 10^6 \text{ kPa}$, con un intervalo de masa para el ion precursor de $\pm 10 \text{ Da}$. Los criterios utilizados para la detección de los picos fueron una relación $S/N \leq 20$ y una resolución > 6000 .

15.5.- Búsqueda en bases de datos

Para la identificación de proteínas mediante PMF, los espectros obtenidos en el análisis por MALDI-TOF se trataron ajustando la línea base, eliminando el ruido (se seleccionaron aquellos picos que presentaron una relación $S/N > 20$) y realizando un desisotopado de los picos para generar un listado de valores que se correspondían con los iones monoisotópicos de cada péptido detectado. A continuación se cotejó el listado de relaciones m/z con los bases de datos mediante el algoritmo de búsqueda MASCOT, el cual efectúa la comparación de los listados de masas medidos con MALDI-TOF con las masas de péptidos de digestiones teóricas de proteínas recogidas en bases de datos. Para realizar las búsquedas se utilizó la base de datos NCBI no

redundante (NCBIInr), eligiendo los siguiente parámetros: todas las entradas como grupo taxonómico, tripsina como enzima de digestión, las cisteínas se consideraron carbamidometiladas, se tuvo en cuenta la oxidación de metioninas como modificación variable, el número máximo de cortes enzimáticos omitidos (*maximum missed cleavages*) fue de 1 y la máxima discrepancia en la masa molecular (*peptide tolerance*) se situó en 50 ppm. El nivel de significancia de cada identificación de las proteínas con los resultados de las búsquedas (*protein score*) estuvo basado en un sistema con una base probabilística. Así, el resultado de cada búsqueda fue calculado como $-10 \cdot \text{Log}_{10}(P)$, donde P es la probabilidad absoluta de que la identificación observada sea un evento producido al azar. Por tanto, un valor pequeño de P indicó que la identificación de la proteína mediante PMF no es un hecho aleatorio. Se consideraron como significativas aquellas búsquedas donde su resultado fuera mayor que un valor mínimo con un nivel de significancia $P \leq 0,05$. Este resultado mínimo fue establecido en cada búsqueda con MASCOT en función de la probabilidad absoluta y del tamaño de la base de datos utilizada.

Para realizar la identificación de las secuencias de los repertorios peptídicos no se restringió ni el tamaño ni el punto isoelectrico de las proteínas, tomando los mismos parámetros de búsqueda que en el análisis de la huella peptídica. Adicionalmente se utilizaron los siguientes parámetros: el numero máximo de cortes enzimáticos omitidos (*maximum missed cleavages*) fue de 1 y la máxima discrepancia en la masa molecular del precursor (*precursor tolerance*) y del fragmento obtenido por EM/EM (*MS/MS fragment tolerance*) fueron de 100 ppm y 0,3 Da respectivamente. Como en las identificaciones mediante análisis de la huella peptídica, se consideraron significativas aquellas búsquedas cuya probabilidad asociada presento un valor mayor que el fijado por el algoritmo MASCOT con un nivel de significancia $P \leq 0,05$.

En el caso de no lograr identificar el péptido mediante búsqueda en bases de datos, se caracterizaron *tags* de la secuencia de los peptidos mediante secuenciación *de novo* utilizando la aplicación DeNovo Explorer del programa 4000 Series Explorer 3.0. La información obtenida se utilizó para identificar la proteína origen mediante el uso del algoritmo de búsqueda de secuencia por similitud FASTS (Mackey *et al.*, 2002). Estas búsquedas fueron llevadas a cabo frente a la base de datos NCBIInr, estableciendo la matriz de puntuación BLOSUM50. Se utilizó la matriz de puntuación más baja, ya que nos sirvió para las alineaciones más divergentes. Los resultados obtenidos fueron considerados significativos si el *E-value* obtenido era inferior a $1 \cdot 10^{-5}$. En este algoritmo el *score* final es resultado de la suma de los *score* de la búsqueda de homología de los péptidos individuales.

16.- Estudio de la funcionalidad de las isoenzimas purificadas

16.1.- Ensayo *in vitro* de la actividad antifúngica

16.1.1.- Condiciones y almacenamiento del cultivo

Se empleo el hongo *Botrytis cinerea* (de Bary), cepa 20518, procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (C.E.C.T, Valencia, España). Para el crecimiento de los hongos se

utilizaron medios sólidos de agar dextrosa de patata (PDA; Scharlab, España) a 25 °C durante 7 días en oscuridad. Tras este tiempo, las esporas fueron recogidas de las placas de Petri con 5 mL de una solución de 1 % Tween-20 en agua ultrapura. El recuento de esporas se realizó con una cámara Neubauer mediante un microscopio óptico EQ-060-MIC (Nikon, Japón). Para el uso a corto plazo (1-2 días), se fijó la concentración de esporas en $1,5 \cdot 10^6$ esporas/mL, almacenándolas a 4 °C en oscuridad. Cuando fue necesario su almacenamiento a largo plazo, las esporas fueron suspendidas en 20 % glicerol (v/v) y almacenadas a -80 °C. Todo el trabajo se realizó bajo estrictas condiciones de esterilidad con el fin de evitar contaminaciones exteriores. Para ello, se empleó una cámara estéril de flujo laminar AV 30/70 (Telstar, España) y todo el material utilizado se esterilizó en un autoclave Autotester-G (Selecta, España) a 121 °C y 103 kPa de presión durante 15 min.

16.1.2.- Ensayo *in vitro* de actividad antifúngica frente a *Botrytis cinerea*

Se estableció un protocolo para determinar el efecto de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas a partir del mesocarpo de chirimoya en la inhibición del crecimiento del micelio del hongo *Botrytis cinerea* según la metodología descrita por Schlumbaum *et al.* (1986) y Mauch *et al.* (1988). Se añadió 10 μ L de la solución obtenida en el apartado 15.1.1. en el centro de placas de Petri de 100 mm x 15 mm con 20 mL de PDA, incubándolas durante 24 h a 25 °C en oscuridad. Cuando el tamaño de la colonia fue de 1 cm, se colocaron filtros de celulosa blancos y estériles de 0,7 cm a un 1 cm de distancia del borde del micelio de la colonia. Se añadieron alícuotas con los extractos de proteínas, entre 60 y 300 μ g, o de las enzimas purificadas, entre 10 y 40 μ g, disueltos en 30 μ L el tampón acetato sódico 20 mM, pH 5,5. Por otro lado, también se determinó el efecto sinérgico en la inhibición del crecimiento de las hifas por la combinación entre diferentes isoenzimas quitinasa o entre isoenzimas 1,3- β -glucanasa e isoenzimas quitinasa. Para ello se prepararon mezclas con la misma cantidad de las diferentes proteínas purificadas, siendo la cantidad de proteína añadida a los discos estériles la mitad que la especificada para los ensayos en solitario. Todas las muestras ensayadas fueron filtradas a través de un filtro estéril de PVDF de 0,22 μ m (Millipore, EE.UU.). En todos los ensayos se incorporó un disco control, el cual sólo contenía tampón acetato sódico 20 mM, pH 5,5. A continuación se incubaron las placas de Petri durante 35 h más y se fotografiaron. De esta manera, si la proteína, o mezcla de ellas, presentase actividad antifúngica, se observaría una zona de inhibición del crecimiento de las hifas del hongo alrededor de los discos. Como criterio cuantitativo de la actividad antifúngica de estas enzimas se determinó el diámetro de esta zona de inhibición de crecimiento de micelio (Iseli *et al.* 1993).

16.2.- Ensayo *in vitro* de la actividad crioprotectora de las isoenzimas purificadas

La determinación de la actividad crioprotectora *in vitro* de las enzimas quitinasas y 1,3- β -glucanasa purificadas se realizó usando un método basado en el descrito por Lin y Thomashow (1992). Se preparó una solución madre de lactato deshidrogenasa V-S de músculo de conejo (LDH, EC 1.1.1.23; Sigma, EE.UU.) 0,02 μ g μ L⁻¹ en tampón 20 mM fosfato potásico, pH 7,5.

Midiendo la recuperación de la actividad de esta enzima sensible a las bajas temperaturas se evaluó la actividad crioprotectora *in vitro* de las proteínas. Se utilizaron mezclas con 3,2 μg de LDH de la solución madre y cantidades crecientes de las isoenzimas purificadas, BSA y sacarosa, en un rango que oscilaba entre 0,04 y 204,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y un volumen final de 250 μL . La disolución resultante fue congelada en nitrógeno líquido durante 30 s y se descongeló a temperatura ambiente durante 5 min. El proceso de congelación-descongelación fue llevado a cabo dos veces, midiendo posteriormente la actividad LDH residual. Ésta fue ensayada añadiendo 50 μL de las muestras anteriores al tampón de ensayo (80 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM KCl; 2 mM ácido pirúvico y 0,3 mM NADH) a temperatura ambiente y en un volumen final de 2 mL. Se cuantificó la aparición de NAD^+ registrando el descenso de absorbancia a 340 nm a temperatura ambiente durante 3 min. Se midió la actividad enzimática de dos controles con LDH en tampón 20 mM fosfato potásico, pH 7,5: uno que fue sometido al proceso de congelación-descongelación y otro que no fue inactivado. Los datos de actividad crioprotectora se mostraron como el porcentaje de actividad residual frente al control no congelado. El valor DP_{50} (concentración de proteína crioprotectora necesaria para alcanzar un porcentaje de actividad LDH residual del 50 %) se determinó representando semilogárfmicamente el porcentaje de actividad LDH residual frente a la concentración de la proteína con actividad crioprotectora.

16.3.- Determinación de la actividad anticongelante de las isoenzimas purificadas

A la hora de determinar la posible actividad anticongelantes de las proteínas purificadas de mesocarpo de chirimoya, se optó por la medida de la actividad de histéresis termal (THA, *thermal hysteresis activity*) mediante la utilización de un DSC822e (Mettler-Toledo, EE.UU.). El calorímetro diferencial de barrido fue calibrado con indio y n-octano, tomando un crisol vacío de aluminio como referencia. Las proteínas purificadas; BSA, tomada como proteína patrón sin actividad anticongelante; y una AFP glicosilada de tipo III del pez *Macrozoarves americanus* (cedida por el Dr. A. DeVries, Illinois, EE.UU.; DeVries y Cheng, 1992) se disolvieron en agua ultrapura y en tampón citrato sódico 100 mM a una concentración de 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Las muestras (1-2 μL) fueron depositadas, selladas y pesadas en crisoles de aluminio de 40 μL . Los crisoles fueron enfriados desde 25 °C a -40 °C a una velocidad de 10 °C min^{-1} , mantenidos a esta temperatura 5 min y calentadas de nuevo a 25 °C a 0,5 °C min^{-1} . Una vez calculada la temperatura (T_f) y la entalpía de fusión (ΔH_f), se volvieron a enfriar a -25 °C, estabilizándolas a esta temperatura 5 min. Se prosiguió con un calentamiento muy lento (0,5 °C min^{-1}) hasta una temperatura (T_p) de fusión parcial, donde existe una cierta cantidad de hielo. El crisol se dejó en esa temperatura durante 10 min, permitiendo la interacción hielo-proteína. Posteriormente el crisol fue enfriado hasta -25 °C a 0,5 °C/min, observando la aparición de un pico exotérmico de recrystalización del hielo. Integrándolo, se calculó la temperatura (T_c) y la entalpía de recrystalización (ΔH_c). Se definió THA como la diferencia entre T_p y T_c . Este procedimiento experimental se repitió para diferentes T_p con el fin de obtener sistemas donde varíe la cantidad de hielo.

17.- Elaboración análisis filogenético

Con el fin de evaluar la posición evolutiva de la especie *Annona cherimola* dentro del reino de las plantas, se llevó a cabo un análisis filogenético utilizando la información proporcionada por el gen mitocondrial *18S* ARNr utilizando como representantes de las diferentes divisiones a aquellos organismos cuyo genoma está secuenciado totalmente o en una fase avanzada de desarrollo. Las secuencias de nucleótidos públicas descritas para el gen *18S* ARNr fueron obtenidas de la base de datos NCBI. En la Tabla 5 se resumen las secuencias parciales o completas analizadas.

El alineamiento múltiple de secuencias en formato FASTA fue llevado a cabo usando el paquete de análisis T-COFFEE (Notredame *et al.*, 2000) y CLUSTALW XXL (Thompson *et al.*, 1994). La reconstrucción filogenética fue llevada a cabo con el programa PHYLIP (Felsenstein, 1981) por el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987), calculando primero la matriz de distancias entre las secuencias con la aplicación *dnadist*. El soporte estadístico de los nodos del árbol filogenético construido fue evaluado usando un análisis *bootstrap* de 100 remuestreos.

18.- Análisis estadístico

Las medidas de todos los parámetros estudiados se realizaron como mínimo por triplicado y se estudió el efecto del tiempo de conservación a 6 °C sobre los valores obtenidos mediante un análisis de varianza univariante (ANOVA) usando el test LSD, en el que se consideraron estadísticamente significativas las diferencias cuando $P \leq 0,05$. Cuando se determinó el efecto del tiempo y de las condiciones gaseosas de conservación a 6 °C sobre los diferentes parámetros se utilizó un análisis de varianza multivariante (ANOVA) aplicando el test de Bonferroni ($P \leq 0,05$). Además se hizo un análisis del coeficiente de correlación de Pearson entre los valores de actividad crioprotectora *in vitro* de los extractos proteicos y los niveles de los antígenos relacionados con anticuerpos anti-PR2 y anti-PRQ. Para el cálculo de la propagación de los errores experimentales en las diferentes ecuaciones utilizadas se consideró 0,01 s, 0,1 °C y 0,1 mm como los errores absolutos asociados a la medida del tiempo, temperatura y distancia respectivamente.

19.- Herramientas bioinformáticas utilizadas

En el listado que se muestra a continuación, se citan los diferentes programas informáticos, herramientas *web*, algoritmos y bases de datos que fueron utilizadas en esta tesis doctoral, tanto para el desarrollo y análisis de resultados como para su documentación.

- Microsoft Office Word 2003 / Microsoft Office Powerpoint 2003 (Microsoft Corporation, EE.UU.) para generar la documentación pertinente.

- Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, EE.UU.) para la preparación y cálculo numérico de las tablas y figuras de este trabajo.
- MDL ISIS/Draw 2.5 (MDL Information Systems, EE.UU.) para visualizar gráficamente las moléculas usadas en algunas figuras del trabajo.
- StatGraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corporation, EE.UU.) para la elaboración de los análisis estadísticos de los resultados experimentales.
- GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, EE.UU.) para el cálculo de las constantes cinéticas de las diferentes isoenzimas purificadas y la determinación del parámetro DP_{50} .
- Scion Image (Scion Corporation, EE.UU.) en la cuantificación de los niveles de las isoenzimas en los análisis Western.
- STARE (Mettler-Toledo, EE.UU.) para el control y posterior evaluación de los datos obtenidos por el DSC.
- Clarity (Data Apex, República Checa) para la determinación de los niveles de poliaminas mediante espectrofluorometría.
- FPLC Director (Amersham Biosciences, Suecia) fue utilizado en el control y posterior evaluación de los resultados obtenidos en las purificaciones con el FPLC.
- Voyager 2 GHz Acquisition System (Applied Biosystems, EE.UU.) para la adquisición de espectros para la determinación de la masa molecular de las proteínas.
- 4000 Series Explorer 3.0 (Applied Biosystems, EE.UU.) para la obtención y evaluación de los datos de espectrometría de masas del equipo MALDI-TOF/TOF.
- Global Protein Server V3.5 (Applied Biosystems, EE.UU.), para la obtención de los datos de las secuencias de los péptidos fragmentados.
- MASCOT 1.9 (Matrix Science Ltd., EE.UU.) en el cotejo del listado de relaciones m/z con las bases de datos.
- Bases de datos.
 - BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.info/>).
 - ENZYME (<http://us.expasy.org/enzyme/>).
 - IUBMB-Enzyme-Nomenclature (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>).
 - CAZy (<http://www.cazy.org/index.html>).
 - SwissProt (<http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html>).
 - Entrez PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).
 - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

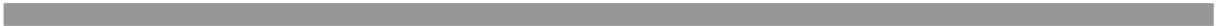
- Algoritmos y paquetes de análisis
 - *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
 - *FASTS* (http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_list2.shtml).
 - *MOWSE* (<http://www.dl.ac.uk/SEQNET/mowse.html>).
 - *T-COFFEE*
(<http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi>)
 - *PHYMLIP* (<http://bioweb.pasteur.fr/phylogeny/intro-en.html>).
 - *CLUSTALW* XXL (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW-XXL.html>)
 - *CLUSTALW* (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>)
 - *BOXSHADE 3.21*
(http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)

Tabla 5. Secuencias utilizadas para la elaboración del árbol filogenético del gen *18S* ARNr de chirimoya

Especie	Nombre común	Tamaño (pb) ^x	Número de acceso ^y
<i>Annona cherimola</i>	Chirimoya	1128 (P)	AY819054
<i>Carica papaya</i>	Papaya	1724 (P)	U42514.1
<i>Cucumis sativa</i>	Pepino	1730 (C)	AF206894.1
<i>Micromonas pusilla</i>	Alga marina	1730 (C)	AJ010408
<i>Ostreococcus 'lucimarinus'</i>	Alga verde unicelular	1727 (P)	AY329636
<i>Physcomitrella patens</i>	Musgo	1818 (C)	X80986
<i>Populus trichocarpa</i>	Álamo californiano	1706 (P)	AY652861
<i>Ricinus communis</i>	Ricino	1777 (C)	L37583.1
<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgo	1960 (C)	NC_008360.1
<i>Vitis vinifera</i>	Uva	2150 (C)	NC_012119.1
<i>Brassica napus</i>	Colza	1850 (C)	NC_008285.1
<i>Citrus trifoliata</i>	Naranjo espinoso	1739 (C)	AF206997.1
<i>Dioscorea alata</i>	Ube / Yam púrpura	1766 (P)	EU817833
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arabidopsis	1902 (C)	X16077
<i>Oryza sativa</i>	Arroz	1700 (C)	NC_007886.1
<i>Glycine max</i>	Soja	1810 (C)	X02623.1
<i>Jatropha curcas</i>	Jatrofa	1451 (P)	AY823528.1
<i>Malus × domestica</i>	Manzana	1063 (P)	DQ341382
<i>Manihot esculenta</i>	Yuca	1736 (P)	AB233568
<i>Milletia pinnata</i>	Pongamia	1668 (P)	AY289629
<i>Musa acuminata</i>	Plátano	1742 (C)	AF069226
<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabaco	1900 (C)	NC_006581.1
<i>Ostreococcus tauri</i>	Alga verde unicelular	1741 (C)	Y15814
<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomate	1800 (C)	X51576.1
<i>Solanum tuberosum</i>	Patata	1807 (C)	X67238.1
<i>Theobroma cacao</i>	Cacao	1728 (C)	AF207040
<i>Triticum aestivum</i>	Trigo	1805 (P)	AY049040
<i>Zea mays subsp. mays</i>	Maiz	1970 (C)	NC_007982.1
<i>Apium graveolens</i>	Apio	1739 (C)	AF06852
<i>Beta vulgaris</i>	Remolacha	1930 (C)	NC_002511.2
<i>Gossypium hirsutum</i>	Algodón	1733 (P)	GHU42827
<i>Helianthus annuus</i>	Girasol	1746 (P)	AF107577
<i>Prunus persica</i>	Melocotón	1769 (C)	L28749.1
<i>Pinus ellioti</i>	Pino elioti	1734 (C)	D38245
<i>Triphysaria eriantha</i>	“Johnny Tuck” (flor)	1740 (P)	OEU38316

^x Secuencia completa del gen (C) o secuencia parcial (P).^y Número de acceso GI de la secuencia en la base de datos NCBI.

RESULTADOS



1.- Determinación ultraestructural del daño por frío mediante LT-SEM y efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂

En la Figura 11 se muestra el análisis mediante LT-SEM de la ultraestructura de células criofijadas del mesocarpo de chirimoyas recién recolectadas y conservadas durante un periodo de tiempo que transcurre entre los 3 y 14 días a 6 °C. Los ensayos por criofractura permitieron revelar la estructura interna de las células, ya que la fragmentación tiende a producirse a lo largo de planos de segmentación que suelen corresponder a membranas celulares. En estas imágenes se pueden distinguir regiones brillantes, que corresponden a la matriz celular condensada y congelada, la membrana citoplasmática o a la pared celular. Asimismo, las regiones oscuras corresponden a las trazas que deja el hielo que sublima durante la preparación de la muestra. Por otro lado, las diferencias observadas en las intensidades de las imágenes están causadas principalmente por la variabilidad existente en la altura de los cristales de hielo, el material celular congelado o la estructura insoluble de los tejidos. Por último, la presencia de objetos similares a redes son debidos al típico artefacto eutéctico originado por la acumulación de solutos solubles durante el proceso de sublimación del agua de la célula (Fig. 11B, C, D, E, I, J, L, M, N).

Una de las ventajas de la criomicroscopía se sitúa en la conservación de las dimensiones de muestras biológicas blandas, evitando la salida del agua y otros compuestos volátiles de estos tejidos. Para ello se opta por una tasa de congelación muy rápida (por inmersión en N₂ líquido), lo cual provoca la vitrificación del agua sin la formación de cristales de hielo que puedan generar daños estructurales. Sin embargo, este proceso sólo se alcanza estrictamente en algunas ocasiones, observándose frecuentemente la presencia de pequeños cristales de hielo que raramente alteran la estructura general de la muestra. En nuestro caso, y como era esperable, la criofijación produjo la aparición de estos cristales de hielo que produjeron pequeños poros en las membranas celulares (Fig. 11A, C, F, H, I, L, M). El hecho de que estos cristales de hielo aparezcan en todos los tejidos analizados indica que el fenómeno de superenfriamiento del agua líquida del interior de las células no parece influido por la temperatura ni el tiempo de conservación de los frutos, concluyendo que la presencia de estos artefactos no tiene por qué afectar a la caracterización de los efectos causados por las bajas temperaturas en la ultraestructura de estos frutos sensibles al frío. En este sentido, esta observación es concordante con los datos mostrados por Yamada *et al.* (2002) para otras plantas tropicales y subtropicales.

Las células parenquimáticas de frutos recién recolectados presentaron una morfología bien definida y unas paredes celulares rígidas, indicando la resistencia de sus constituyentes fibrosos (Fig. 11A). Asimismo, se puede observar como tanto la membrana plasmática como la lamela media mantienen su integridad (Fig. 11B). Un aspecto a reseñar en estas imágenes es que estas células se encuentran llenas de granos compuestos de almidón de varios tamaños, los cuales presentan una morfología aproximadamente esférica y/o elipsoidal con ángulos suaves. También puede observarse como cada uno de estos granos está compuesto por pequeñas subunidades ligeramente separadas y con un tamaño y forma similar. Aparentemente, estas subunidades representan los granos individuales de almidón del fruto, sintetizados y agrupados en el interior

de un amiloplasto, cuya membrana parece intacta. Este hecho se sostiene por la ausencia de espacios vacíos entre los granos de almidón, tal y como se ha observado en arroz (Kim *et al.*, 2004b).

Aunque las células de frutos conservados durante 3 días a 6 °C no mostraron grandes cambios estructurales con respecto a las de los frutos recién recolectados, como puede observarse en la Figura 11C, sí que se empezó a manifestar una cierta desorganización en las membranas plasmáticas, con la presencia de algunos huecos entre la pared celular y el resto de la membrana que rodea al citoplasma (Fig. 11D). La lamela media todavía permanece visible. Sin embargo, es evidente el comienzo de su proceso de degradación, dando lugar a una estructura discontinua. Por otro lado, el número de granos de almidón, aunque siendo aun considerable, disminuyó con respecto a las células de los frutos recién recolectados. Asimismo, los granos de almidón eran ligeramente menores que los observados en el mesocarpo de los frutos en el estado inicial. También presentaron una estructura menos cohesionada, apareciendo pequeños espacios intergranulares e indicando una posible degradación de la membrana del amiloplasto (Fig. 11C).

La conservación prolongada a 6 °C provocó la aparición de un alto grado de desorganización tisular, que se hizo más patente con el paso del tiempo (Fig. 11E y G). Las Figuras 11F y H permitieron observar con más detalle una serie de fenómenos como son la completa desaparición de la lamela media, probablemente asociada a la solubilización de la pectina; la presencia de grandes espacios entre la pared celular y la membrana plasmática, provocado probablemente por una reducción en las propiedades de barrera de dicha membrana; y la apariencia ondulatoria de estas paredes. Todos estos factores conllevaron la pérdida de la turgencia y de la forma redondeada hallada en las células de los frutos recién recolectados. Además, el espacio intercelular en las células de frutos conservados a 6 °C durante 14 días presentó una forma irregular, en contraste con lo observado en los frutos recién recolectados (Fig. 11H) cuyas células presentaron espacios regulares y con un perfil triangular (Fig. 11B). Asimismo, resulta interesante resaltar que muchos espacios intercelulares aparecen llenos de grandes cantidades de solutos solubles y/o material insoluble, dando lugar a una apariencia similar a los artefactos eutécticos habituales (Fig. 11H). En estas condiciones de conservación es un hecho la práctica desaparición de los granos de almidón del mesocarpo del fruto.

Por otro lado, como puede observarse en las imágenes de LT-SEM, el pretratamiento con altas concentraciones de CO₂ tuvo un efecto beneficioso sobre los daños ultraestructurales provocados en el mesocarpo de la chirimoya por la conservación a bajas temperaturas. Durante el tratamiento gaseoso, la ultraestructura de los frutos tratados presentó características intermedias entre las de los frutos no tratados tras 3 días a 6 °C y las de los recién recolectados (Fig. 11I). En este sentido, tanto la organización tisular general (Fig. 11I) como el número de granos de almidón (Fig. 11J) parecía similar a lo descrito en los frutos no tratados. Sin embargo, en la imagen mas detallada también se observó una mayor adhesión entre la membrana plasmática y la pared celular, semejante a los frutos recién recolectados (Fig. 11J).

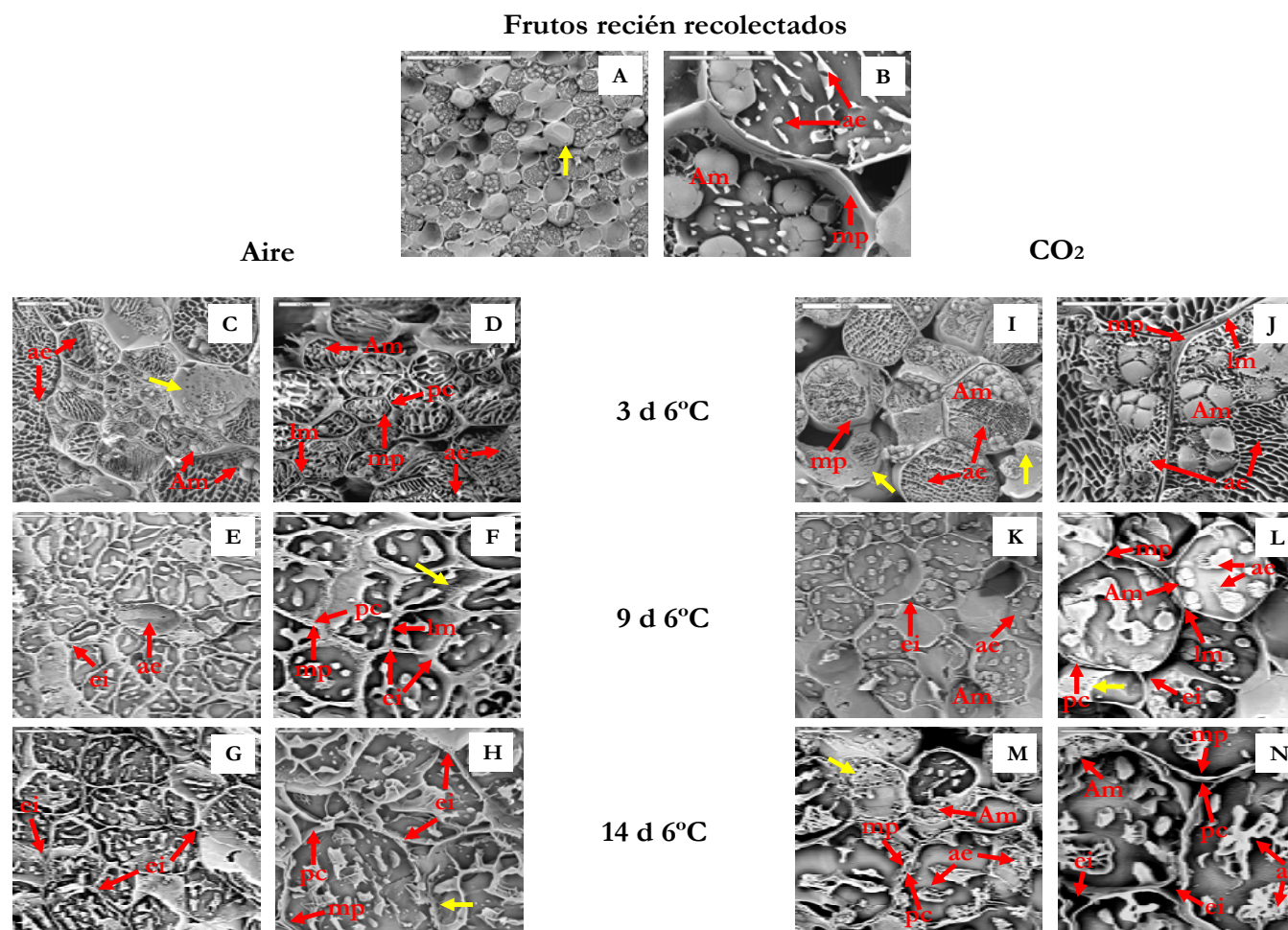


Figura 11. Ultraestructura del mesocarpio de chirimoya durante la conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. Observaciones mediante LT-SEM de células crio fracturadas del mesocarpio de frutos recién recolectados (A), frutos conservados 3, 9 y 14 días a 6 °C (C, E y G), y frutos pretratados con altas concentraciones de CO₂ tras un periodo de conservación de 3, 9 y 14 días a 6 °C (I, K y M). Imágenes detalladas de la estructura del citoplasma y de los espacios intercelulares para frutos recién recolectados (B), frutos conservados 3, 9 y 14 días a 6 °C (D, F y H) y frutos tratados tras 3, 9 y 14 días a 6 °C (J, L y N). Las barras representan 200 μm (A), 50 μm (E, G, I, K) y 20 μm (B, C, D, F, H, J, L, M, N). **es**, espacio intercelular; **pc**, pared celular; **mp**, membrana plasmática; **lm**, lamela media; **Am**, amiloplasto; **ae**, artefacto eutéctico. Los poros causados por la presencia de cristales de hielo se señalan en las imágenes mediante una flecha de color amarillo.

Frente al colapso celular descrito anteriormente en los frutos conservados durante 9 días a 6 °C (Fig. 11E), se contrapone una estructura celular (Fig. 1K) más cercana a la advertida en células del mesocarpo de chirimoyas conservadas únicamente 3 días a 6 °C (Fig. 11C). Así, las células mantuvieron la integridad de sus membranas y paredes celulares, conservando la turgencia inicial. De hecho, las paredes celulares se encontraban tan fuertemente unidas que resultaba difícil distinguir la lamela media en las imágenes (Fig. 11L). Como resultado de estos contactos intercelulares más estrechos, la densidad y números de los espacios intercelulares disminuyó en comparación con los frutos no tratados (Fig. 11E y K). Asimismo, estos espacios mostraron una morfología similar a la descrita en los frutos recién recolectados, encontrándose únicamente llenos de aire (Fig. 11K y L). Además del mantenimiento de la estructura celular, también se puede observar una mayor cantidad de gránulos de almidón que en las células de los frutos no tratados, en donde su presencia es meramente testimonial (Fig. 11F y L). En este sentido, parece que el tratamiento gaseoso reduce cuantitativa y cualitativamente el proceso de degradación del almidón de los amiloplastos. No obstante, la conservación a bajas temperaturas durante 9 días produjo una degradación completa de la membrana de estos plástidos, similar a la observada en los frutos no tratados conservados durante 3 días a 6 °C (Fig. 11D y L). Sin embargo, una mayor exposición de los frutos tratados a las bajas temperaturas hizo patente la aparición de una serie de cambios ultraestructurales asociados al daño por frío, como son la aparición de huecos entre la pared celular y la membrana plasmática (Fig. 11M). En la Figura 11N se muestra con más detalle la pérdida de adhesión entre estos dos componentes celulares. Aun con todo, las células de los frutos tratados y conservados durante 14 días a 6 °C presentaron una menor desorganización tisular y un mayor número de granos de almidón que las de los frutos no tratados de su misma edad cronológica. Asimismo, aunque los espacios intercelulares mostraron un perfil irregular como los frutos no tratados, es patente la ausencia de material intercelular en su interior (Fig. 11H y N).

2.- Papel de los solutos compatibles en la conservación a bajas temperaturas y efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂

Como se ha mencionado en la *Introducción*, bajo el término de solutos compatibles se engloban aquellos compuestos orgánicos de bajo peso molecular y altamente solubles que se acumulan en las plantas en respuesta a diferentes tipos de estrés ambiental, como el ocasionado por las bajas temperaturas o el déficit de agua. Dentro de estos compuestos, muchos de ellos con propiedades osmoprotectoras, encontramos diferentes azúcares como sacarosa o rafinosa, aminoácidos como prolina, derivados de éstos como glicina betaína o aminas alifáticas como las poliaminas. Por todo ello se examinaron los cambios en los niveles de algunos de estos solutos compatibles que se producen en respuesta a la conservación a 6 °C y la modulación de ésta por el tratamiento con altas concentraciones de CO₂.

2.1.- Aminoácidos libres

La Figura 12 refleja una medida cuantitativa de la concentración de aminoácidos libres de los diferentes extractos del mesocarpo de chirimoyas conservadas a bajas temperaturas, en aire y tras el tratamiento con altas concentraciones de CO₂. Así, el perfil observado en los frutos conservados a 6 °C reflejó dos tendencias contrapuestas. Tras un descenso significativo durante los tres primeros días a bajas temperaturas, la concentración de aminoácidos libres experimentó un ligero aumento, situándose en valores cercanos a los de los frutos recién recolectados después de 9 días a 6 °C. Esta acumulación se agudizó en la fase final del periodo de conservación, detectándose una concentración de $16,31 \pm 0,22 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ peso fresco, duplicando prácticamente los valores iniciales (Fig. 12). Por otro lado, el tratamiento gaseoso no varió significativamente los valores de aminoácidos libres a lo largo de la conservación a 6 °C, manteniendo una cantidad similar a la de los frutos recién recolectados (Fig. 12)

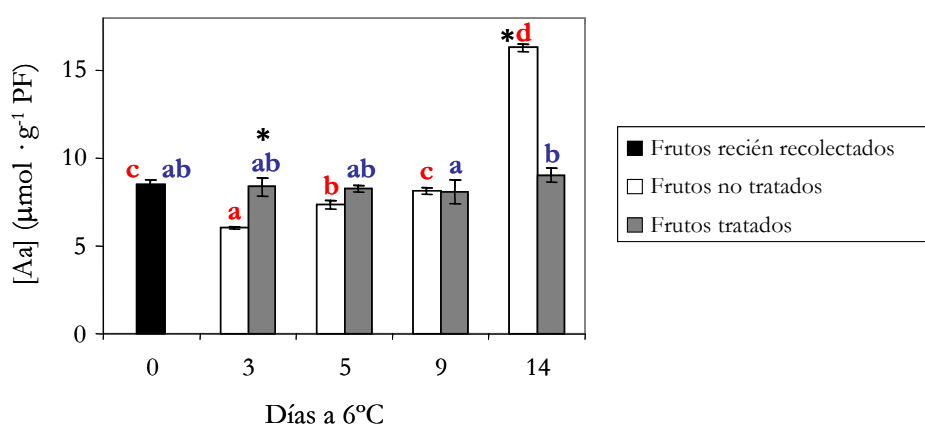


Figura 12. Cambios en el contenido de aminoácidos libres en el mesocarpo de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones de 3 extracciones diferentes \pm DE. Los valores que mostraron diferente letra en la parte superior de las barras son significativamente diferentes a lo largo del periodo de conservación para una condición determinada (AIRE/CO₂) al nivel elegido (análisis univarianza ANOVA con test LSD y $P \leq 0,05$). Los valores que mostraron un asterisco en la parte superior de las barras son significativamente diferentes el uno del otro al nivel elegido (análisis multivarianza ANOVA con test de Bonferroni y $P \leq 0,05$).

La mayor parte de los aminoácidos libres del mesocarpo de chirimoyas recién recolectadas, en torno a un 93 %, correspondieron a ácido aspártico, ácido glutámico, serina y prolina, representando éste último un 47 % del total detectado en los cromatogramas (Fig. 13). Si atendemos a la evolución de este iminoácido, el comienzo de la conservación a bajas temperaturas se acompañó de un pequeño descenso no significativo en la concentración de prolina, pasando después de 3 días a 6 °C de $3,91 \pm 1,28$ a $2,69 \pm 0,03 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ peso fresco (Fig. 14). Esta disminución fue transitoria, ya que al quinto día a 6 °C se habían recuperado los niveles iniciales, manteniéndose los niveles sin diferencias significativas tras 9 días a 6 °C. Sin embargo, al final del periodo de conservación la concentración de prolina se incrementó hasta alcanzar una concentración de $10,80 \pm 0,65 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ peso fresco, valor que resulta un 276 % mayor al descrito en frutos recién recolectados (Fig. 14).

La aplicación del pretratamiento con altas concentraciones de CO_2 modificó el efecto de las bajas temperaturas sobre la evolución de la concentración de prolina. A lo largo de la conservación, y tanto en los frutos en tratamiento como en los transferidos a al aire, los niveles de prolina variaron en un rango de concentraciones en los que no se observan diferencias significativas con respecto al estado inicial. Por tanto, en los frutos tratados con altas concentraciones de CO_2 no se produce el marcado incremento en la concentración de prolina, observado en los frutos no tratados al final de la conservación a bajas temperaturas (Fig. 14).

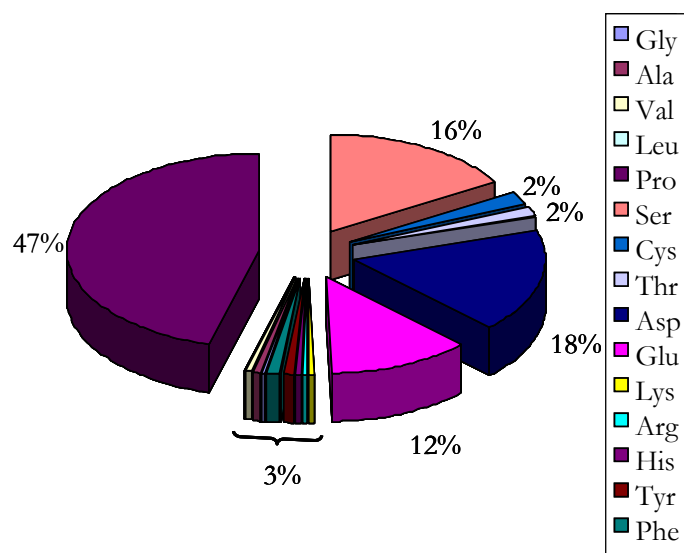


Figura 13. Distribución de los aminoácidos libres en el mesocarpo de frutos de chirimoya recién recolectados.

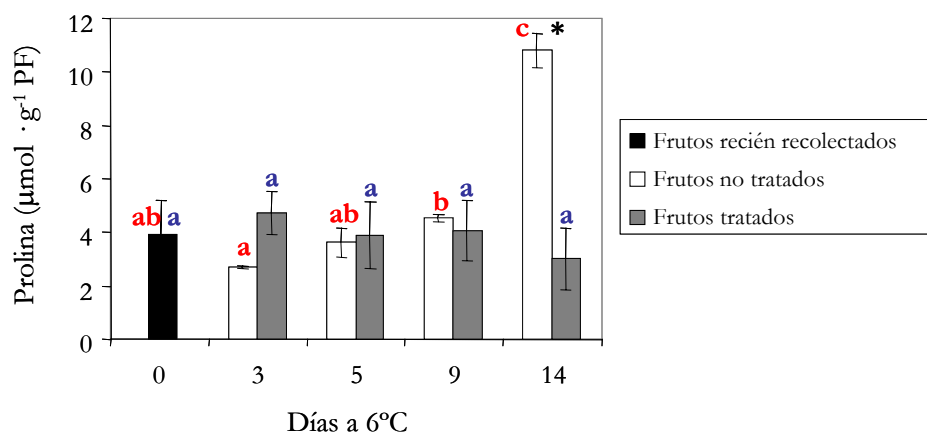


Figura 14. Cambios en el contenido de prolina en el mesocarpio de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones de 3 extracciones diferentes \pm DE. Los valores que mostraron diferente letra en la parte superior de las barras son significativamente diferentes a lo largo del periodo de conservación para una condición determinada (**AIRE/CO₂**) al nivel elegido (análisis univarianza ANOVA con test LSD y $P \leq 0,05$). Los valores que mostraron un asterisco en la parte superior de las barras son significativamente diferentes el uno del otro al nivel elegido (análisis multivarianza ANOVA con test de Bonferroni y $P \leq 0,05$).

2.2.- Azúcares solubles y almidón

Durante la conservación a bajas temperaturas, el nivel de azúcares solubles totales en los frutos se incremento de manera considerable, pasando de una concentración de $107 \pm 6,1$ a 580 ± 30 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco (Fig. 15A). Sin embargo, este aumento no se produce de forma progresiva, sino en dos etapas claramente diferenciadas. Como se puede observar en la Figura 15A, los frutos recién recolectados presentaron un mínimo en la concentración de azúcares totales, experimentando un aumento cercano al 200 % durante los primeros días de conservación, al que siguió un descenso estadísticamente significativo tras 5 días a 6 °C. La segunda fase implicó un segundo aumento a los 9 días de conservación triplicando los valores anteriores, y estabilizándose posteriormente el resto del periodo de conservación a 6 °C. De estos azúcares, la glucosa y la fructosa fueron los compuestos principales que contribuyeron al aumento observado anteriormente, incrementando sus niveles de $39,5 \pm 2,2$ a 220 ± 10 y de $45,9 \pm 2,8$ a 260 ± 20 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco, respectivamente, durante el periodo de conservación (Fig. 15A). Aunque la sacarosa también se acumuló en el fruto siguiendo una pauta similar a la observada en los azúcares totales y los dos monosacáridos anteriores, su aumento fue significativo pero menor en el comienzo de la segunda etapa (9 días 6 °C). Este hecho contrasta con la acumulación puntual de este disacárido durante el periodo de tiempo que transcurre entre el tercer y quinto de conservación. Si atendemos al ratio de sucrosa:(glucosa + fructosa), éste aumenta significativamente ($P \leq 0,05$) de 0,26 a 0,36 y 0,37 después de 3 y 5 días a 6 °C respectivamente, disminuyendo posteriormente a valores que oscilan entre 0,16 y 0,18 durante la segunda etapa de acumulación en frutos no tratados. Por último, no se advirtió la presencia en los cromatogramas de azúcares diferentes a los citados.

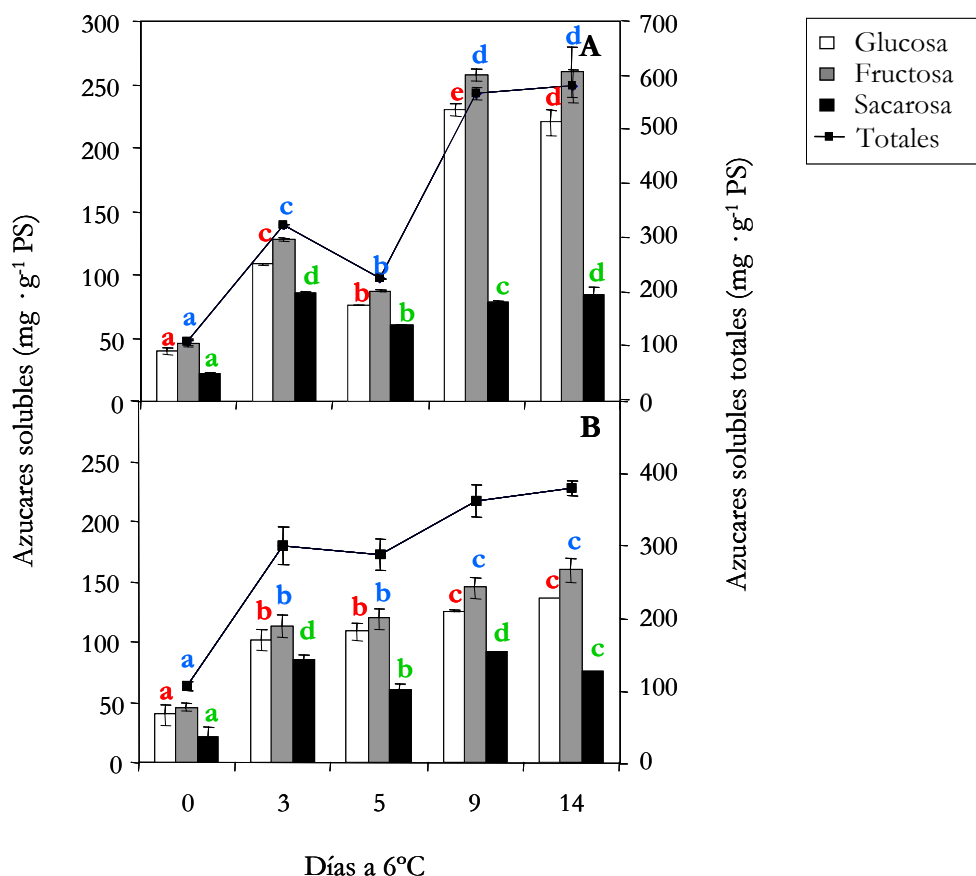


Figura 15. Cambios en el contenido de azúcares solubles en el mesocarpio de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire (A) y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂ (B). Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones de 3 extracciones diferentes \pm DE. Los valores que mostraron diferente letra en la parte superior de las barras son significativamente diferentes a lo largo del periodo de conservación para un determinado azúcar (glucosa/fructosa/sacarosa) al nivel elegido (análisis univarianza ANOVA con test LSD y $P \leq 0,05$).

La concentración de azúcares solubles totales en el mesocarpio de frutos tratados con CO₂ durante la conservación a 6 °C mostró resultados diferentes a los encontrados en los frutos no tratados. Si bien la acumulación siguió una evolución paralela en los primeros días, el tratamiento gaseoso se caracterizó por unos valores inferiores al de los frutos no tratados de su misma edad cronológica al final del periodo de conservación en frío. Así, el valor máximo alcanzado a los 14 días (380 ± 10 mg · g⁻¹ peso seco) fue ligeramente superior a los niveles hallados en los frutos no tratados a los 3 días de conservación (Fig. 15B). Atendiendo a los cambios en cada uno de los azúcares, los niveles de sacarosa no presentaron diferencias significativas con los de los frutos no tratados, salvo tras 9 días a 6 °C donde la concentración era significativamente mayor en los frutos tratados con CO₂. En el caso de la glucosa y la fructosa, las concentraciones fueron considerablemente inferiores a las de los frutos no tratados. Parece evidente que el descenso del nivel de azúcares totales en los frutos tratados se debe a la pauta seguida por estos monosacáridos a lo largo de la conservación a 6 °C. En este sentido, mientras que el ratio de sucrosa:(glucosa + fructosa) disminuye significativamente en frutos no tratados después de 9 días a 6 °C, en frutos tratados con altas concentraciones de CO₂ aumenta hasta

0,39. El valor de este parámetro es similar al descrito en frutos tratados y no tratados tras 3 días a 6 °C. De forma similar a lo que ocurre durante la conservación de los frutos no tratados, no se observó la presencia de azúcares diferentes a los mencionados en los cromatogramas.

En la Figura 16 se muestra la evolución de la concentración de almidón y de los SST durante la conservación a 6 °C en las dos condiciones de conservación utilizadas. En los frutos conservados en aire la hidrólisis de almidón fue casi total, pasando de $449,1 \pm 6,76$ a $58 \pm 2,56$ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco tras 14 días a 6 °C (Fig. 16A). Este proceso de amilólisis vino acompañado por un aumento significativo en el contenido de sólidos solubles totales ($11,1 \pm 0,6$ - $19,4 \pm 0,5$ °Brix), parejo a la pauta seguida por los niveles de azúcares solubles totales. El tratamiento con altas concentraciones de CO_2 provocó una disminución en la velocidad de degradación de almidón. El contenido de almidón de los frutos tratados fue significativamente mayor a lo largo del periodo de conservación a 6 °C, hidrolizándose únicamente el 53 % del presente en los frutos recién recolectados. Como en los frutos no tratados, la disminución en el contenido de almidón está correlacionada con un aumento en el contenido de sólidos solubles totales ($11,1 \pm 0,6$ - $16,2 \pm 0,6$ °Brix), como se muestra en la Figura 16B.

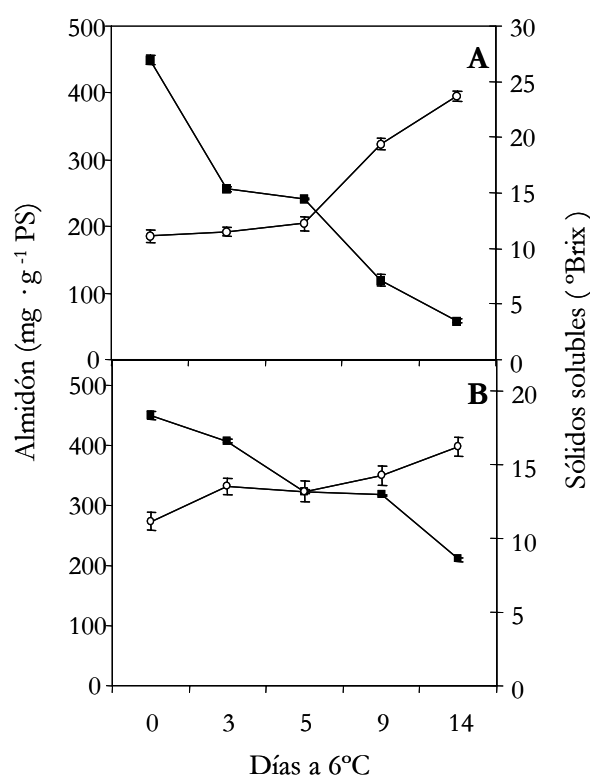


Figura16. Cambios en el contenido de almidón y de sólidos solubles totales en el mesocarpio de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire (A) y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO_2 (B). Almidón (■); sólidos solubles totales (○). Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones de 3 extracciones diferentes \pm DE.

2.3.- Glicina betaína

El ensayo espectrofotométrico de determinación de glicina betaína mostró que la cantidad de esta amina cuaternaria es mayor en los frutos recién recolectados que en aquellos

sometidos a un largo proceso de conservación a 6 °C, tal y como puede observarse en la Figura 17. Aunque la concentración de glicina betaína después de 3 días de conservación es significativamente mayor a la observada en los frutos recién recolectados ($128,8 \pm 3,82$ a $157,3 \pm 5,61 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ peso fresco), se trata de un aumento transitorio. La evolución posterior implicó un descenso del 50 % a los 5 días antes de incrementar ligeramente hasta el final del periodo de conservación. Así, los niveles detectados tras 14 días a 6 °C alcanzaron una concentración un 20 % inferior al estado inicial ($110,6 \pm 7,82 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ peso fresco).

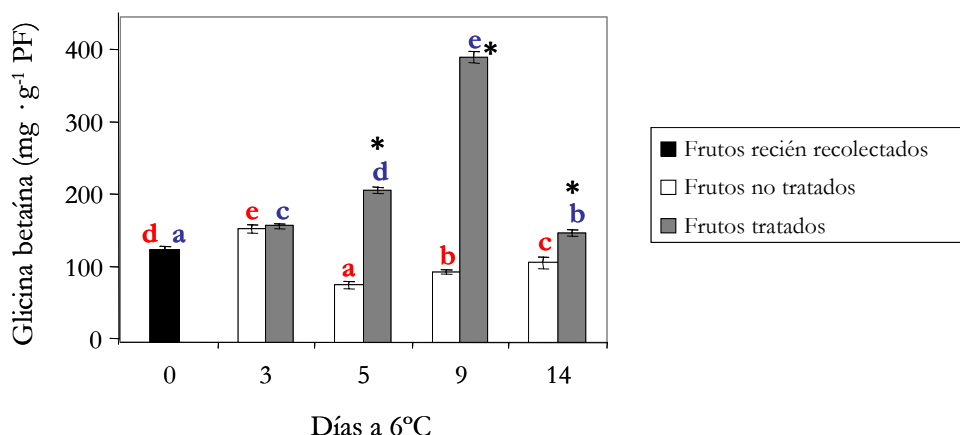


Figura 17. Cambios en el contenido de glicina betaína en el mesocarpio de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones de 3 extracciones diferentes \pm DE. Los valores que mostraron diferente letra en la parte superior de las barras son significativamente diferentes a lo largo del periodo de conservación para una condición determinada (AIRE/CO₂) al nivel elegido (análisis univarianza ANOVA con test LSD y $P \leq 0,05$). Los valores que mostraron un asterisco en la parte superior de las barras son significativamente diferentes el uno del otro al nivel elegido (análisis multivarianza ANOVA con test de Bonferroni y $P \leq 0,05$).

El pretratamiento con un 20 % de CO₂ durante 3 días a 6 °C tuvo un fuerte efecto inductor en la acumulación de glicina betaína en chirimoya. Como se muestra en la Figura 17, la síntesis de este compuesto se incrementó de una forma similar a la observada en los frutos no tratados en los primeros días de conservación. Sin embargo, la transferencia de los frutos tratados a aire después de tres días vino acompañada de un moderado aumento a partir del quinto día, alcanzando su valor máximo tras 9 días a 6 °C, del orden de $400 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ peso fresco. A continuación se detectó una brusca disminución (61 %) en la concentración de glicina betaína, alcanzando un valor cercano al observado en los frutos recién recolectados al final del periodo de conservación. Durante la conservación, y exceptuando el primer punto de muestreo, el tratamiento gaseoso implicó unas cantidades de glicina betaína significativamente superiores a las descritas en los frutos no tratados.

2.4.- Poliaminas libres

La Figura 18 muestra la evolución de la concentración de putrescina, espermidina y espermina libres, así como el sumatorio de estos tres compuestos, en el mesocarpo de chirimoya durante su conservación a 6 °C y el efecto del tratamiento con altas concentraciones de CO₂. En el caso de los frutos no tratados, el contenido de poliaminas totales disminuyó de forma significativa ($P \leq 0,05$) durante los 3 primeros días de conservación, manteniéndose estos niveles hasta los 14 días donde se produce un aumento notable en la concentración de poliaminas totales, aproximando su valor al de los frutos recién recolectados (Fig. 18A). Si concretamos la pauta seguida por cada una de las poliaminas libres en particular, el contenido de putrescina (Fig. 18B) varió según un patrón que recuerda, en líneas generales, al perfil de las poliaminas totales. Tras 3 días a 6 °C se observa una disminución transitoria ($17,03 \pm 2,47$ a $14,10 \pm 0,84$ nmol · g⁻¹ peso fresco), que se mantiene hasta el quinto día. Entre el quinto y el decimocuarto día la concentración de putrescina se incrementó significativamente, superando al final del periodo de conservación la cantidad alcanzada en el estado inicial (en torno al 40 %). Las bajas temperaturas también disminuyeron la concentración de espermidina en los frutos no tratados. Sin embargo, en esta poliamina el descenso inicial fue mucho más pronunciado, cerca de un 50 %, manteniendo estos bajos niveles hasta el noveno día a 6 °C. El resto del periodo de conservación se caracterizó por un aumento similar al observado en la putrescina, aunque su magnitud relativa fue mucho menor y la concentración final de espermidina fue significativamente inferior a la de los frutos recién recolectados (Fig. 18C). La conservación a 6 °C no afectó a la cantidad de espermina presente en los frutos de chirimoya. A excepción de una pequeña disminución inicial, que no fue significativa ($P \leq 0,05$), la concentración de espermina se mantuvo en valores en torno a los encontrados en los frutos recién recolectados (Fig. 18D).

Tal y como muestra la figura 18A, el pretratamiento con altas concentraciones de CO₂ por 3 días mantuvo los niveles iniciales de poliaminas totales en estos frutos. Sin embargo, tras el paso a flujo continuo de aire se observó una drástica disminución, alcanzando unos niveles similares a los observados en los frutos no tratados. A partir de este momento la evolución fue idéntica, independientemente de las condiciones de conservación aplicadas. Sin embargo, el incremento final fue de menor cuantía, siendo la cantidad de poliaminas totales un 27 % inferior a la de los frutos recién recolectados (Fig. 18A). Altas concentraciones de CO₂ incrementaron significativamente el contenido de putrescina en frutos conservados 3 días a 6 °C., alcanzando el valor máximo absoluto en comparación al existente en los frutos no tratados (Fig. 18B). La conservación posterior de los frutos tratados implicó un descenso significativo de los niveles de putrescina. Estos se mantuvieron cercanos a los detectados en el estado inicial, salvo tras 9 días a 6 °C donde se encontraron los mínimos valores para la diamina. Asimismo, la comparación con los frutos no tratados desvela que siguen tendencias especulares, encontrándose el punto de simetría en el quinto día de conservación a 6 °C. Al analizar el efecto del tratamiento con altas concentraciones de CO₂ sobre la evolución de la espermidina, se observó que el perfil de descenso brusco de los frutos no tratados resultó atenuado, manteniendo, al paso de los frutos a flujo continuo de aire, concentraciones similares a las detectadas en los frutos no tratados (Fig.

18C). Como muestra la Figura 18D, la concentración de espermina en frutos tratados se mantuvo siempre por debajo de la encontrada en los frutos recién recolectados, siendo significativo el descenso producido tras 3 días a 6 °C. El paso a aire se acompañó de una estabilización en la concentración de esta tetramina para situarse en valores mínimos al final de la conservación. No se observaron diferencias significativas con los frutos no tratados, salvo tras 14 días a 6 °C, hecho ocasionado por el fuerte descenso antes descrito (Fig. 18D).

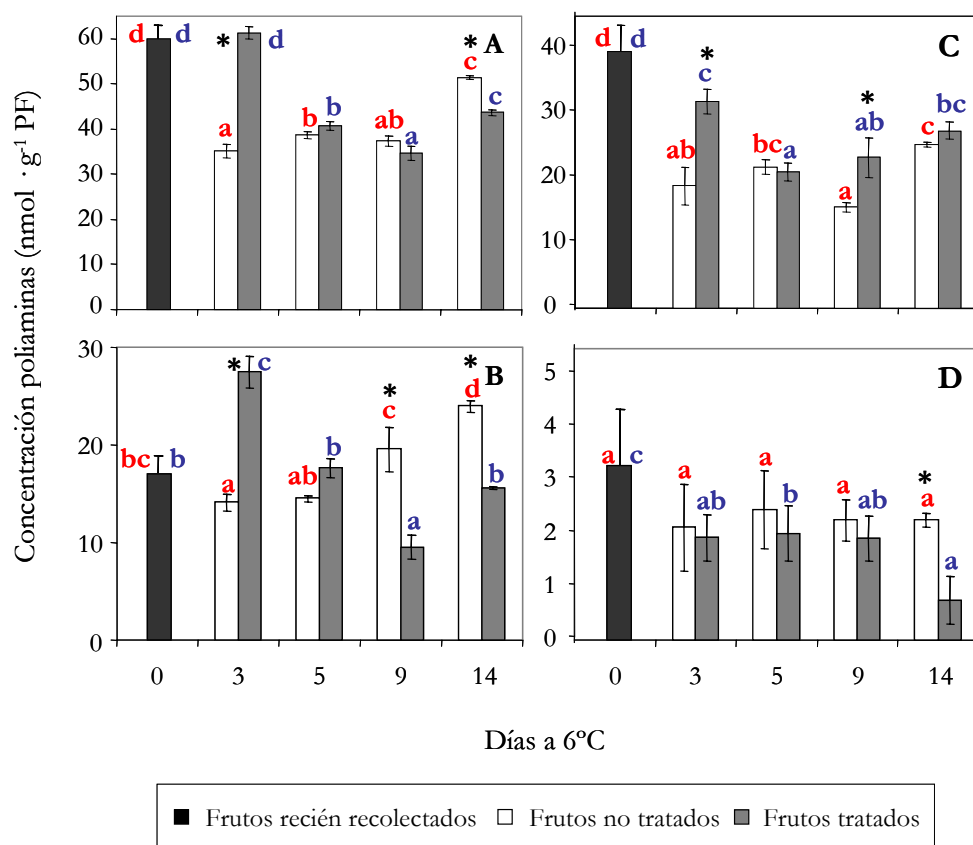


Figura 18. Cambios en el contenido de poliaminas en el mesocarpio de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. (A) Poliaminas totales; (B) Putrescina; (C) Espermidina; (D) Espermina. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones de 3 extracciones diferentes \pm DE. Los valores que mostraron diferente letra en la parte superior de las barras son significativamente diferentes a lo largo del periodo de conservación para una condición determinada (AIRE/CO₂) al nivel elegido (análisis univarianza ANOVA con test LSD y $P \leq 0,05$). Los valores que mostraron un asterisco en la parte superior de las barras son significativamente diferentes el uno del otro al nivel elegido (análisis multivarianza ANOVA con test de Bonferroni y $P \leq 0,05$).

3.- Distribución de la actividad enzimática y del patrón de isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa durante la maduración y la conservación a bajas temperaturas. Efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂

Con objeto de determinar el efecto de la conservación a bajas temperaturas y del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂ sobre las enzimas de defensa quitinasa y 1,3- β -glucanasa, tanto en su actividad hidrolítica como en su patrón de inducción, se realizaron ensayos de actividad enzimática y análisis electroforéticos (SDS-PAGE e inmunoensayo) de muestras de mesocarpio de chirimoyas, tratadas o no, a lo largo de su conservación a 6 °C. Asimismo, para caracterizar en detalle la fisiología postcosecha de las chirimoyas, se estudiaron ambos parámetros durante la maduración a 20 °C.

Una vez obtenidos extractos proteicos enriquecidos en actividad hidrolítica de ambas enzimas mediante la precipitación por saturación con sulfato de amonio, se separaron las proteínas en dos fracciones, ácidas y básicas, en función de su punto isoelectrico, siguiendo la metodología indicada en el apartado 6 de *Materiales y métodos*. El carácter ácido o básico de estas fracciones se fundamentó en las condiciones experimentales establecidas en la separación cromatográfica por intercambio aniónico. Las especificaciones técnicas indican que la resina de la columna Mono-Q HR 5/5 puede adsorber proteínas que presenten, al menos, un pI una unidad inferior al pH del tampón utilizado. Puesto que el pH se ajustó a 8,0, la columna separó aquellas proteínas con un pI \leq 7,0, eluyendo por el volumen muerto las proteínas con un pI $>$ 7,0. Además, la elucidación del patrón de isoenzimas permitió determinar cuales de ellas son constitutivas y cuales se indujeron de forma diferencial por efecto del frío y/o del tratamiento gaseoso. Este aspecto fue vital a la hora de establecer las isoenzimas candidatas para el proceso de purificación y caracterización posterior.

3.1.- Evolución de las actividades quitinasa y 1,3- β -glucanasa

Se midieron las actividades quitinasa y 1,3- β -glucanasas, expresadas como $\Delta A_{550} \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ PF y μ mol glucosa equivalente $h^{-1} \cdot g^{-1}$ PF, respectivamente, del precipitado proteico con sulfato de amonio al 85 % de saturación y de las fracciones ácidas y básicas de frutos no tratados y tratados con altas concentraciones de CO₂ a lo largo de la conservación a 6 °C y durante la maduración a 20 °C.

3.1.1.- Actividad enzimática quitinasa

Como se puede ver en la Figura 19A, la actividad quitinasa del precipitado de sulfato de amonio de frutos no tratados presentó dos máximos de actividad similares a lo largo de la conservación a 6 °C, el primero después de tres días y el segundo tras nueve días. Tras el máximo inicial se detectó una pérdida en la actividad, aunque ésta era significativamente superior a la de los frutos recién recolectados. A continuación se produjo el mencionado aumento que recuperó temporalmente los niveles de los primeros días de conservación a 6 °C (3 días). La subsiguiente

perdida de actividad enzimática hizo que el periodo de conservación terminara con valores sin diferencias significativas con los frutos recién recolectados.

La presencia de actividad quitinasa en las fracciones ácidas y básicas de los frutos tratados y no tratados reveló de forma indirecta que el mesocarpio de chirimoya poseía isoenzimas ácidas y básicas de esta enzima hidrolítica (Fig. 19). Aunque en el estado inicial se observó como el mayor porcentaje de actividad quitinasa se encontraba en la fracción básica, en torno a un 69 % del total, las bajas temperaturas cambiaron radicalmente este patrón de distribución de actividades en los frutos no tratados. Así, los tres primeros días a 6 °C se acompañaron de una considerable pérdida de actividad, próxima al 90 %, en la fracción básica y de un drástico aumento, quintuplicando sus valores, en la fracción ácida. A partir de este momento, se produjo un descenso progresivo de la actividad enzimática en la fracción ácida hasta los 9 días, para finalizar el ensayo, tras 14 días a 6 °C, con niveles casi tres veces superiores a los alcanzados en los frutos recién recolectados. En la fracción básica se alcanzó un máximo transitorio de actividad tras 9 días a 6 °C, igualando en ese momento el valor alcanzando en el estado inicial del fruto. El resto del periodo de conservación se caracterizó por una brusca disminución de la actividad quitinasa, la cual no presentó diferencias significativas con la observada al principio de la conservación (3 días).

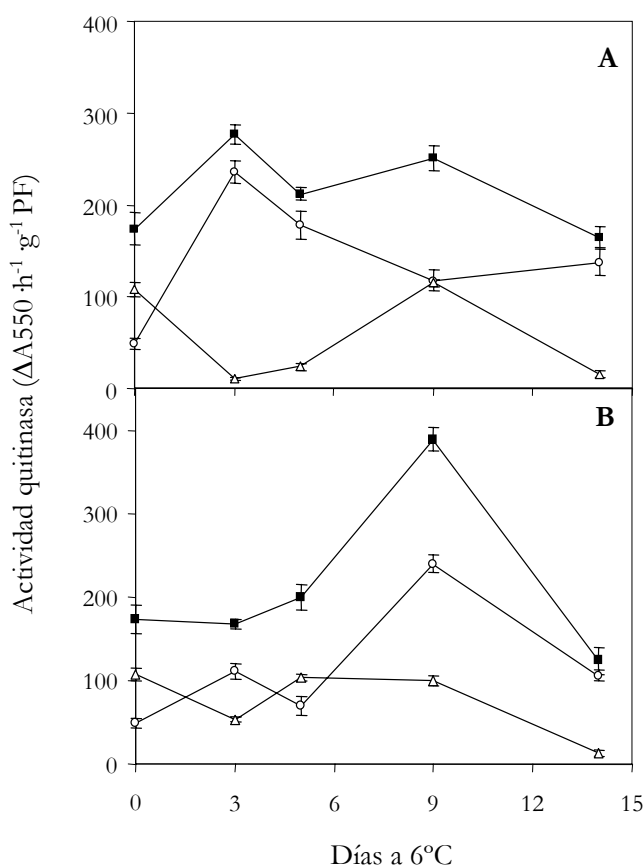


Figura 19. Evolución de la actividad quitinasa de las diferentes fracciones proteicas obtenidas a lo largo de la purificación de extractos de mesocarpio de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire (A) y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂ (B). Precipitado sulfato amonio (■); fracción ácida (○); fracción básica (△). Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones de 3 extracciones diferentes ± DE. Se determinó la significancia estadística de los valores de una misma fracción proteica a lo largo del periodo de conservación mediante un análisis univarianza ANOVA con test LSD y P≤0,05.

El efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂ durante 3 días alteró drásticamente el patrón general de actividad quitinasa observado en los precipitados de sulfato de amonio de los frutos no tratados. Al final del tratamiento (3 días) se observó como los valores de actividad quitinasa no presentaban diferencias significativas con los descritos en los frutos recién recolectados, siendo un 35 % inferiores a los existentes en los frutos no tratados. El paso a aire se acompañó de un aumento progresivo en la actividad enzimática hasta alcanzar, después de 9 días, un máximo que era entre 1,5 y 2 veces superior al registrado en los frutos no tratados y recién recolectados, respectivamente (Fig. 19B). A partir de este momento comenzó una franca disminución de la actividad quitinolítica, concluyendo el periodo de conservación con niveles inferiores a los de los frutos no tratados.

Asimismo, también se modificó la distribución de actividad quitinasa entre las fracciones ácida y básica en los frutos tratados. Según se aprecia en la Figura 19B, en los primeros días de conservación la actividad enzimática de las dos fracciones siguió un perfil de dientes de sierra, sin grandes cambios, como se ha mencionado antes, en la actividad quitinasa total. Sin embargo, a partir del quinto día se observó un fuerte aumento en la actividad quitinasa de la fracción ácida, manteniéndose ésta en la fracción básica. Como resultado de esta tendencia se alcanzó un máximo absoluto en la fracción ácida a los 9 días, duplicando los niveles registrados en los frutos no tratados de la misma edad cronológica. A partir de este momento comenzó un descenso en la actividad quitinasa de ambas fracciones, que culminó a los 14 días de conservación con un valor mínimo de actividad en la fracción básica, sin diferencias significativas con el medido en los frutos no tratados, y con niveles en la fracción ácida que no mostraron tampoco diferencias significativas con los frutos recién recolectados.

Durante el periodo de maduración de este fruto a 20 °C, la evolución de la suma de las actividades quitinasa de ambas fracciones fue disminuyendo gradualmente con respecto al estado inicial, reduciéndose cerca de 5 veces después de cuatro días (Tabla 6). Sin embargo, estos cambios en la actividad quitinasa no siguieron una evolución paralela en las dos fracciones estudiadas. Como se puede observar en la Tabla 6, en las horas inmediatas a la recolección de los frutos, los valores de la fracción ácida reflejaron un descenso superior al 80 %. La tendencia cambia a partir de este momento. Primero se experimentó un aumento significativo, que lleva al máximo del ensayo el segundo día de maduración, con unos niveles que casi duplican los valores encontrados en los frutos recién recolectados. Una disminución constante de esta actividad acompañó al resto del periodo de maduración a 20 °C, finalizando el ensayo en unos valores significativamente inferiores a los descritos en el estado inicial. En cambio, en el caso de la fracción básica se detectó un brusco descenso de la actividad quitinasa a partir del segundo día, tras una suave disminución después de 1 día a 20 °C. A partir de este momento, la actividad quitinasa básica se mantuvo sin diferencias significativas a lo largo del periodo de maduración a 20 °C, mostrando unos valores que sólo alcanzaban el 8 % de los encontrados en los frutos recién recolectados (Tabla 6).

Tabla 6. Evolución de la actividad quitinasa y 1,3- β -glucanasa de las diferentes fracciones proteicas obtenidas a lo largo de la purificación de extractos de mesocarpio de chirimoya durante su maduración a 20 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂

Días a 20 °C	Fracción ácida		Fracción básica	
	Actividad quitinasa ($\Delta A_{550} \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PF}$)	Actividad 1,3- β -glucanasa ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PF}$)	Actividad quitinasa ($\Delta A_{550} \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PF}$)	Actividad 1,3- β -glucanasa ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PF}$)
0	48,54 \pm 1,45 ^x c ^y	3,38 \pm 0,09 b	107,86 \pm 0,86 d	9,81 \pm 0,45 d
1	9,95 \pm 0,99 a	2,42 \pm 0,21 a	82,66 \pm 4,38 c	4,69 \pm 0,14 c
2	83,96 \pm 0,54 e	6,94 \pm 0,91 d	8,43 \pm 1,22 a	1,80 \pm 0,09 a
3	52,91 \pm 1,55 d	2,62 \pm 0,40 c	8,68 \pm 0,62 a	1,68 \pm 0,06 a
4	28,38 \pm 1,13 b	3,01 \pm 0,13 b	9,16 \pm 1,44 a	3,89 \pm 0,17 d
3 (20 % CO ₂)	12,15 \pm 1,99 a	7,21 \pm 0,39 d	51,74 \pm 1,40 b	7,56 \pm 0,15 e

^x Cada valor proviene de la media de tres determinaciones diferentes de la actividad hidrolítica \pm DE.

^y Los valores que mostraron diferente letra dentro de una columna son significativamente diferentes al nivel elegido (análisis univarianza ANOVA con test LSD y $P \leq 0,05$).

En la Tabla 6 también se muestra la evolución de la actividad quitinasa en las diferentes fracciones del mesocarpio de chirimoyas mantenidas en una atmósfera con altas concentraciones de CO₂ a 20 °C. Las determinaciones se realizaron inmediatamente después de terminar el tratamiento de 3 días, con el objeto de observar los cambios inducidos por éste. En este sentido, la aplicación del tratamiento gaseoso modificó los niveles de actividad quitinasa en los frutos tratados con respecto a los detectados en aquellos no tratados de la misma edad cronológica, siendo menores en la fracción ácida y mayores en la básica. Sin embargo, estos valores fueron del orden de los hallados en frutos no tratados tras 1 día a 20 °C.

3.1.2.- Actividad enzimática 1,3- β -glucanasa

La evolución de la actividad 1,3- β -glucanasa bajo las distintas condiciones de conservación fue similar en el precipitado de sulfato de amonio (Fig. 20). Así, durante los primeros días de conservación se observó una disminución paulatina, alcanzando un mínimo en la actividad tras 5 días a 6 °C. Sin embargo, aunque comparten la misma pauta de variación, los valores de actividad de los frutos tratados siempre fueron significativamente mayores que los de los frutos no tratados. Seguidamente se detectó un fuerte aumento en la actividad 1,3- β -glucanasa, llegando a un máximo transitorio después de 9 días a 6 °C en ambos tipos de frutos, el cual fue siempre superior a los valores iniciales. A partir de este momento, disminuyó la actividad de forma gradual en los frutos tratados y no tratados, situándose sus niveles tras 14 días a 6 °C por debajo de los observados en los frutos recién recolectados (un 52 y un 42 % respectivamente).

De un modo similar al descrito en la actividad quitinasa, se detectó actividad 1,3- β -glucanasa en ambas fracciones de los extractos de los frutos tratados y no tratados, indicando la presencia de isoenzimas ácidas y básicas (Fig. 20). A pesar del paralelismo entre el perfil de distribución inicial de la actividad 1,3- β -glucanasa y el observado para la actividad quitinasa, con una preeminencia de actividad hidrolítica en la fracción básica (74 %), la evolución de éste durante la conservación a 6 °C de los frutos no tratados fue completamente diferente (Fig. 20A). Durante los primeros 5 días de conservación se observó un descenso en paralelo de las actividades ácidas y básicas hasta alcanzar niveles casi indetectables, siendo esta disminución más rápida en la fracción ácida. Inmediatamente después, entre 5 y 9 días a 6 °C, se observa un aumento de diferente magnitud en las dos fracciones analizadas. Mientras que la actividad de la fracción básica presentó un máximo absoluto, superando en un 40 % los valores de los frutos recién recolectados, la actividad 1,3- β -glucanasa ácida se situó en los niveles del estado inicial, no encontrándose diferencias significativas entre ambos puntos de muestreo. Como se aprecia en la Figura 20A, un mayor tiempo de conservación a 6 °C implicó un descenso en la actividad de ambas fracciones, especialmente acusado en el caso de la fracción ácida, concluyendo el ensayo con niveles menores a los alcanzados en los frutos recién recolectados (en torno al 4 % para la fracción ácida y al 55 % para la fracción básica).

Tal y como se observa en la figura 20B, el tratamiento gaseoso tuvo un efecto inmediato en la distribución de actividad 1,3- β -glucanasa, especialmente en la fracción ácida. Durante la aplicación del tratamiento, el descenso que se produjo en esta fracción fue mucho más matizado en los frutos tratados, alcanzando valores tras 3 días a 6 °C significativamente mayores que en los frutos no tratados. Sin embargo, la disminución en la fracción básica fue de una cuantía similar a la observada en los frutos no tratados. Tras el paso a flujo continuo de aire, se observó un fuerte descenso de actividad en las dos fracciones ensayadas de los frutos tratados, detectando niveles significativamente menores a los de los frutos no tratados. La contribución relativa de cada fracción en el máximo de actividad después de 9 días a 6 °C fue similar, contrastando este hecho con lo observado en los frutos no tratados. Por último, remarcar que aunque los frutos tratados mantienen en común con los no tratados el descenso final tras 14 días a 6 °C, conservando unos niveles semejantes de actividad en la fracción básica, éste fue menos drástico en la fracción ácida.

Como se puede comprobar en la Tabla 6, la actividad 1,3- β -glucanasa total mantuvo una tendencia decreciente a lo largo del periodo de maduración en aire a 20 °C, situándose en valores que oscilaban entre un 30 y un 65 % de los cuantificados en el estado inicial. Sin embargo, como se aprecia en la misma tabla, la actividad 1,3- β -glucanasa ácida evolucionó inicialmente siguiendo una alternancia de mínimos y máximos consecutivos. Así, el mínimo absoluto se observó tras 1 día a 20 °C y el máximo, con un valor que duplica al detectado en los frutos recién recolectados, aconteció en el segundo día de maduración. A continuación, un progresivo descenso de esta actividad enzimática la llevó a valores finales sin diferencias significativas con los iniciales. La actividad 1,3- β -glucanasa de la fracción básica disminuyó de forma sostenida en el mesocarpo de la chirimoya a lo largo de la maduración. El descenso durante los primeros 2 días fue tal, que los valores obtenidos sólo representaban cerca de un 20 % de los encontrados en los frutos recién

recolectados. No obstante, a partir del tercer día de maduración se invirtió esta tendencia, alcanzando el último día de conservación niveles de actividad 1,3- β -glucanasa básica cercanos a los detectados tras 1 día a 20 °C (Tabla 6).

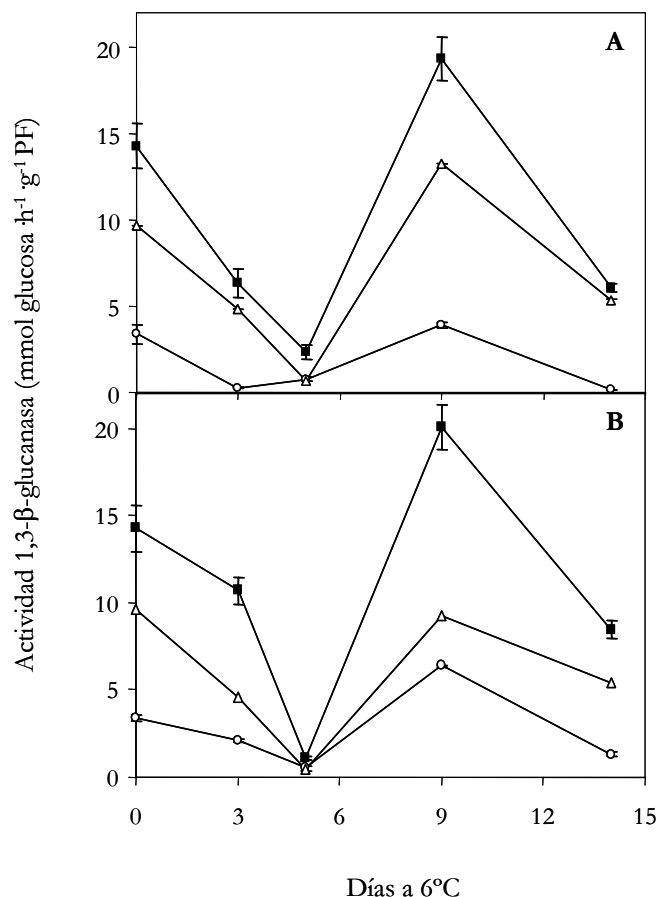


Figura 20. Evolución de la actividad 1,3- β -glucanasa de las diferentes fracciones proteicas obtenidas a lo largo de la purificación de extractos de mesocarpio de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire (A) y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂ (B). Precipitado sulfato amonio (■); fracción ácida (○); fracción básica (△). Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones de 3 extracciones diferentes \pm DE. Se determinó la significancia estadística de los valores de una misma fracción proteica a lo largo del periodo de conservación mediante un análisis univarianza ANOVA con test LSD y $P \leq 0,05$.

En el caso de la actividad 1,3- β -glucanasa, el pretratamiento de 3 días con altas concentraciones de CO₂ tuvo un efecto muy diferente al descrito para la enzima quitinasa durante la maduración a 20 °C. Así, una vez pasados 3 días a 20 °C, se detectó un brusco aumento, situándose su valor en torno a un 300 % mayor con respecto a los frutos no tratados de la misma edad cronológica. Si nos centramos en la actividad de esta enzima en la fracción básica, el tratamiento gaseoso implicó un efecto inductor similar al de la fracción ácida (Tabla 6).

3.2.- Patrón de isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa

Se determinó el patrón de inducción de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa con el objetivo de caracterizar los cambios cualitativos y cuantitativos durante la conservación a 6 °C en frutos tratados y no tratados con altas concentraciones de CO₂. Para ello, las proteínas del mesocarpo de chirimoya de las diferentes fracciones separadas por cromatografía de intercambio aniónico fueron desnaturalizadas, separadas mediante SDS-PAGE y detectadas con ensayos de inmunodetección, tal y como se describe en las secciones 9.1 y 9.2 de *Materiales y métodos*.

El patrón de proteínas ácidas y básicas detectadas con anticuerpos policlonales de tabaco frente a quitinasas y 1,3- β -glucanasa, reveló que el mesocarpo de chirimoyas recién recolectadas presentaba un complejo patrón de isoenzimas de estas dos enzimas hidrolíticas (Fig. 21 y 23). Para facilitar la descripción, la nomenclatura de las isoenzimas estuvo basada en su carácter ácido o básico y en su masa molecular estimada electroforéticamente (Tabla 15).

Asimismo, se realizaron inmunoensayos de otras enzimas PR-Q y PR-2 procedentes de plantas (quitinasa básica de clase I procedente de *Castanea sativa* y 1,3- β -glucanasa básica de clase I de *Vitis vinifera*), con el fin de determinar la posibilidad de una reacción cruzada por parte de los anticuerpos utilizados en este trabajo. En este sentido, no se observó la presencia de una reacción positiva entre antígenos de enzimas quitinasa y anticuerpos relacionados con enzimas 1,3- β -glucanasa o viceversa. Este resultado nos permitió descartar la posibilidad de este error experimental en la identificación de bandas.

3.2.1.- Análisis de isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa ácidas

En la Figura 21 se puede observar como en el momento de la recolección, el mesocarpo del fruto presentaba 4 isoenzimas quitinasas ácidas, dos de ellas de alto peso molecular y presentes con una cierta abundancia relativa (AChi70 y AChi40), y otras dos de bajo peso molecular y representadas por bandas con una intensidad más débil (AChi27 y AChi14). En los frutos no tratados, el efecto inicial de la conservación a 6 °C en los niveles de las dos isoenzimas constitutivas más abundantes fue el de un brusco descenso, siendo éste especialmente remarcable en el caso de AChi70. Sin embargo, la pauta seguida posteriormente implicó una recuperación, primero, y un máximo transitorio tras 9 días a 6 °C, después, en los valores de abundancia relativa de estas dos isoenzimas (Fig. 22). Por otro lado, la conservación a bajas temperaturas intensificó la acumulación de la isoenzima AChi27, duplicando los valores presentes en los frutos recién recolectados, salvo a los días donde se detectó un mínimo transitorio que no mostró diferencias significativas con el estado inicial. El patrón de inducción seguido por la banda de la isoenzima AChi14 en los frutos no tratados presentó unos niveles casi indetectables durante la conservación a 6 °C. Sin embargo, el efecto más destacado de la conservación a bajas temperaturas en frutos no tratados fue la inducción de tres nuevas isoenzimas quitinasas: AChi48, acumulada de forma preferencial a partir de 5 días a 6°C, AChi26, que presentaba mayores niveles en los primeros días de conservación, y AChi24, sólo detectada tras 3 días a 6 °C (Fig. 21).

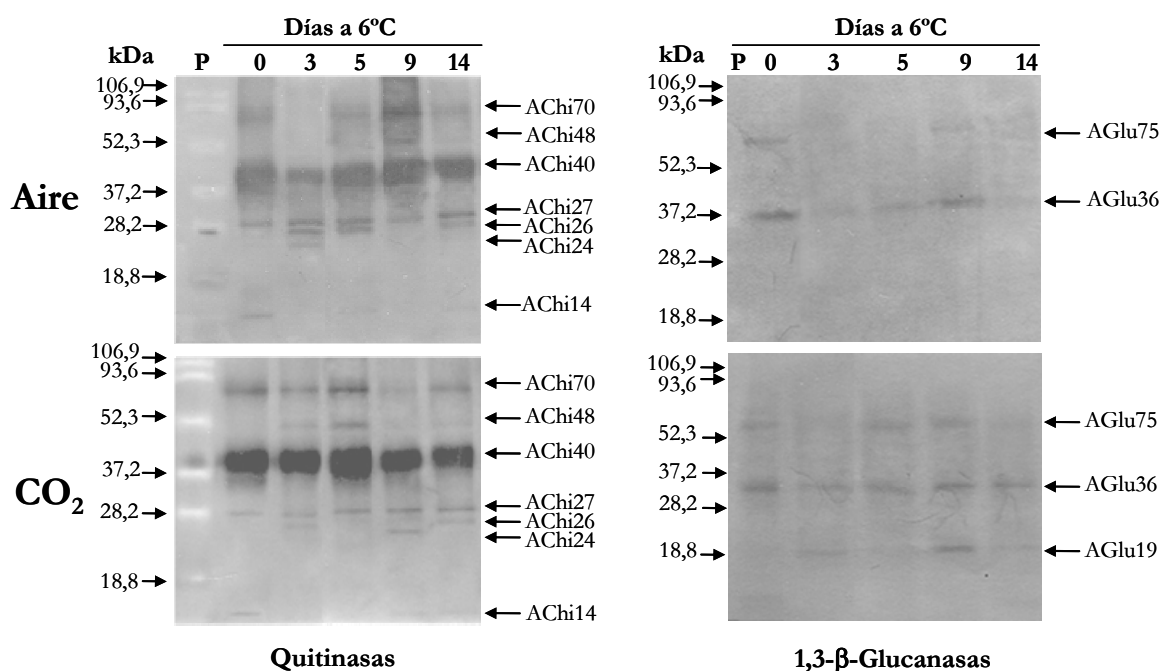


Figura 21. Detección mediante inmunoensayo de isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa ácidas obtenidas de extractos del mesocarpio de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. Los extractos proteicos (5 µg) fueron separados mediante SDS-PAGE (13,5 % poliacrilamida), electrotransferidos a membranas de PVDF y detectados con anticuerpos de tabaco frente a proteínas PR-Q (quitinasa) y PR-2 (1,3-β-glucanasa). Las flechas indican las masas moleculares de las proteínas patrón utilizadas. Carril P, patrón masas moleculares; carril 0, frutos recién recolectados; carril 3-14, días de conservación a 6 °C.

La fracción ácida de los extractos de frutos tratados con CO₂ mostró la presencia durante la conservación a 6 °C de las cuatro isoenzimas quitinasas constitutivas y de las tres inducidas diferencialmente en los frutos no tratados (Fig. 21). Las bandas correspondientes a AChi70 y AChi40 presentaron un patrón de inducción similar. La conservación a bajas temperaturas mantuvo niveles cercanos a los observados en los frutos recién recolectados, con un máximo transitorio a los 5 días significativamente menor que el detectado en frutos no tratados después de 9 días (Fig. 22). En el caso de AChi27, no se observó un efecto inmediato del tratamiento gaseoso, manteniendo los niveles observados en los frutos no tratados. Pero la transferencia a aire de estos frutos indujo un fuerte aumento en la intensidad de la banda de este polipéptido, siendo sus valores a lo largo de la conservación muy superiores a los descritos en frutos no tratados. Asimismo, remarcar que la banda de la isoenzima AChi14 se mantuvo en niveles de acumulación relativa semejantes a los de los frutos no tratados. En el caso de las isoenzimas inducidas por el frío, el máximo de acumulación de la isoenzima AChi48 se adelantó a los 5 días de conservación. Por otro lado, la inducción coordinada de la isoenzima AChi24 y AChi26 sólo se observó después de 9 días a 6 °C, mostrando un retraso de 6 días con respecto a los frutos no tratados (Fig. 21).

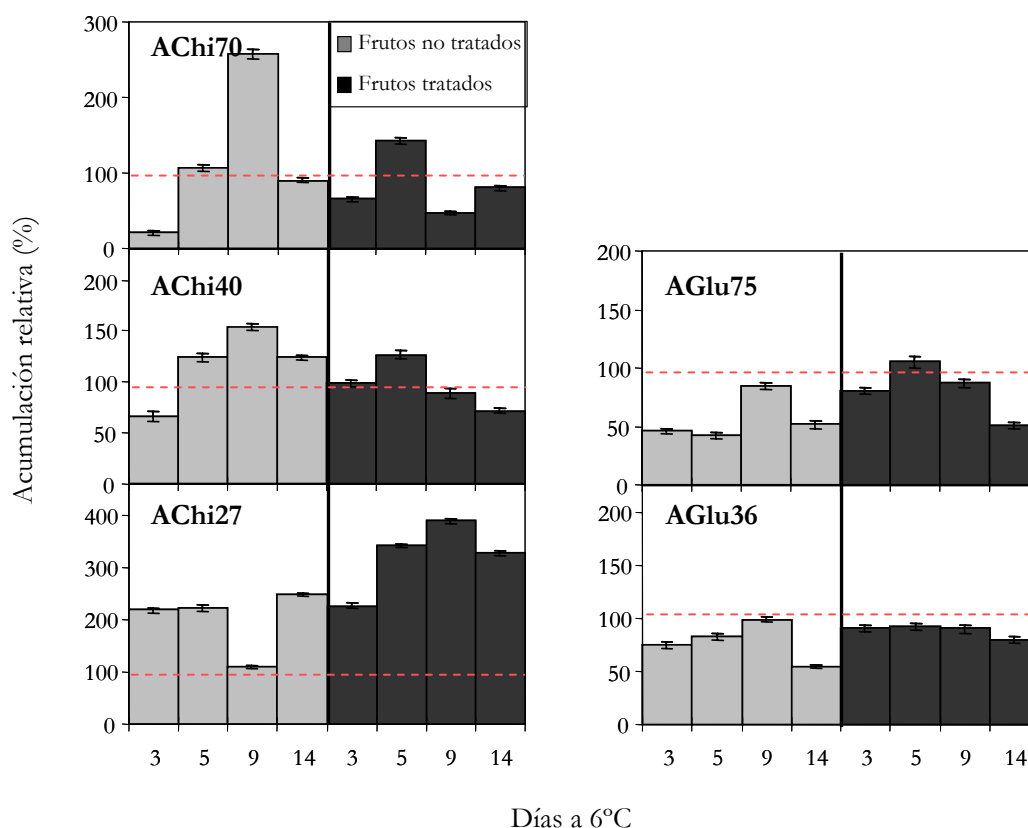


Figura 22. Intensidades de las bandas de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa ácidas constitutivas de extractos del mesocarpio de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. Los valores de densidad óptica fueron normalizados (100 %) con respecto a los obtenidos en los frutos recién recolectados (---). Cada valor corresponde a la media de dos determinaciones por escáner de 3 filmes de auto-radiografía diferentes \pm DE. Se determinó la significancia estadística de los valores de una misma condición de conservación a lo largo del periodo de la misma mediante un análisis univarianza ANOVA con test LSD y $P \leq 0,05$.

El inmunoensayo de las proteínas electrotransferidas mediante la utilización de anticuerpos frente a proteínas PR-2 (1,3- β -glucanasas) reveló la presencia de dos isoenzimas constitutivas en la fracción ácida de los frutos recién recolectados, AGlu75 y AGlu36 (Fig. 21). La intensidad de la banda correspondiente a AGlu75 disminuyó considerablemente a lo largo de la conservación a bajas temperaturas en los frutos no tratados, recuperando transitoriamente los valores iniciales tras 9 días a 6 °C. Aunque en el caso de la isoenzima AGlu36, la evolución seguida fue similar, el descenso inicial fue de una menor magnitud (Fig. 22).

Como se puede observar en la Figura 21, en los frutos tratados los anticuerpos frente a 1,3- β -glucanasas reconocieron la presencia de 3 bandas: las dos isoenzimas constitutivas antes descritas y un tercer polipéptido de baja masa molecular (AGlu19). Globalmente, el tratamiento gaseoso mantuvo los niveles de abundancia relativa de las isoenzimas AGlu75 y AGlu36 por encima de los observados en los frutos no tratados, especialmente en el caso de la isoenzima de mayor masa molecular. Sin embargo, estos valores fueron siempre significativamente menores que los detectados en el estado inicial (Fig. 12). La isoenzima AGlu19, inducida diferencialmente por las bajas temperaturas y el tratamiento con altas concentraciones de CO₂, fue detectada en

todos los puntos de muestreo a lo largo de la conservación a bajas temperaturas, mostrando su máximo de acumulación tras 9 días a 6 °C (Fig. 21).

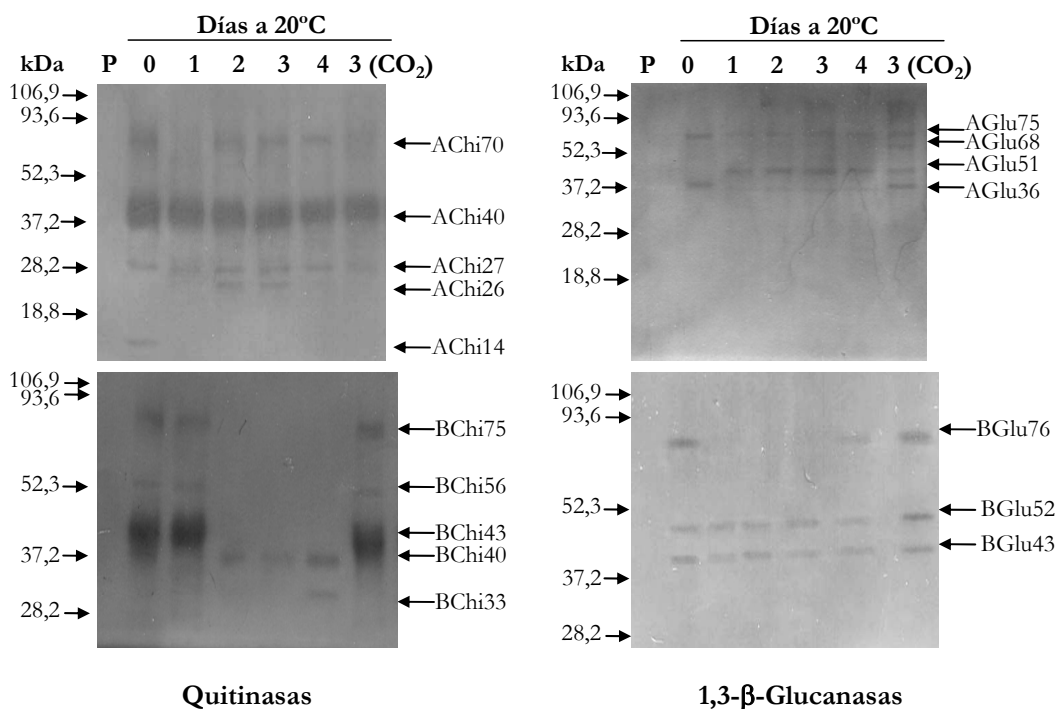


Figura 23. Detección mediante inmunoensayo de isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa ácidas y básicas obtenidas de extractos del mesocarpio de chirimoya durante la maduración a 20 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. Los extractos proteicos (5 µg) fueron separados mediante SDS-PAGE (13,5 % poliacrilamida), electrotransferidos a membranas de PVDF y detectados con anticuerpos de tabaco frente a proteínas PR-Q (quitinasa) y PR-2 (1,3-β-glucanasa). Las flechas indican las masas moleculares de las proteínas patrón utilizadas. Carril P, patrón masas moleculares; carril 0, frutos recién recolectados; carril 1-4, días de maduración a 20 °C.

El conjunto de resultados anteriores pone de manifiesto que en chirimoya algunas de las isoenzimas quitinasa (AChi48, AChi26, AChi24) y 1,3-β-glucanasas (AGlu19) descritas se inducen en respuesta a la conservación a bajas temperaturas o por el efecto combinado de bajas temperaturas y pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. Para comprobar esta hipótesis, se estudió por inmunoensayo, bajo los mismos criterios expuestos anteriormente, el patrón de isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa de las fracciones ácidas y básicas obtenidas de los frutos durante la maduración a 20 °C y de aquellos pretratados con altas concentraciones de CO₂ durante 3 días a 20 °C (Fig. 23).

Así, durante la maduración a 20 °C el perfil de isoenzimas quitinasa ácidas del mesocarpio de chirimoya se modificó. Al entrar en un análisis exhaustivo de la variación de los niveles de abundancia relativa de las bandas constitutivas, se puede constatar como AChi40 y AChi70 presentaron intensidades similares o significativamente menores que las descritas en los frutos recién recolectados durante los 4 días de maduración (Fig. 24). En el caso de la isoenzima AChi27, la conservación a 20 °C implicó una fuerte acumulación, alcanzando niveles que duplicaron los detectados en el estado inicial. Por otro lado, no se apreció la presencia de la isoenzima AChi14 durante el periodo de maduración. Asimismo, a los 2 y 3 días de maduración

se indujo la isoenzima AChi26, también acumulada durante la conservación a bajas temperaturas (Fig. 23).

Por otro lado, en la Figura 23 también se puede constatar como el patrón resultante después del tratamiento con altas concentraciones de CO₂ no mostró la inducción de isoenzimas diferentes a las descritas en los frutos recién recolectados. Asimismo, y de un modo similar a lo observado anteriormente con la actividad quitinasa, los frutos tratados durante el proceso de maduración mostraron un perfil y niveles de acumulación de las bandas constitutivas que se asemejaron en gran medida a los encontrados en frutos no tratados tras 1 día a 20 °C (Fig. 23 y 24).

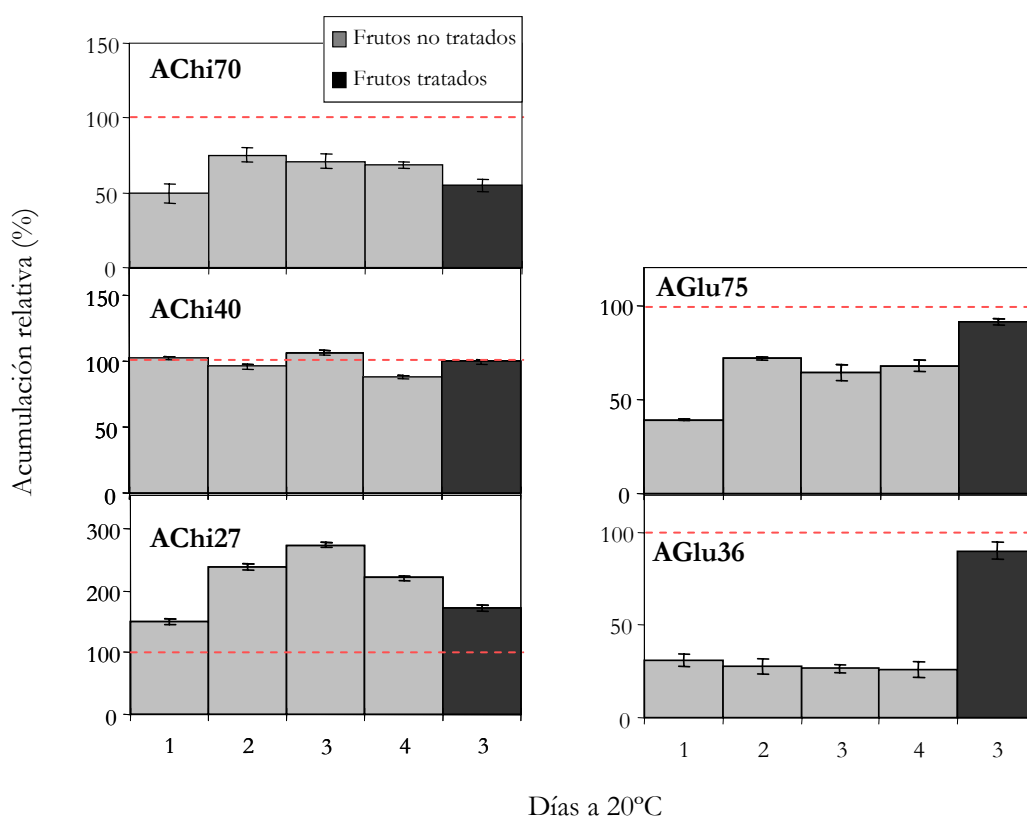


Figura 24. Intensidades de las bandas de isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa ácidas constitutivas de extractos del mesocarpio de chirimoya durante la maduración a 20 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. Los valores de densidad óptica fueron normalizados (100 %) con respecto a los obtenidos en los frutos recién recolectados (---). Cada valor corresponde a la media de dos determinaciones por escáner de 3 filmes de autoradiografía diferentes \pm DE. Se determinó la significancia estadística de los valores a lo largo del periodo de conservación mediante un análisis univariante ANOVA con test LSD y $P \leq 0,05$.

Sin embargo, la maduración a 20 °C modificó de una manera más acentuada el patrón de la enzima 1,3- β -glucanasa del mesocarpio de la chirimoya, con la inducción diferencial de dos nuevas isoenzimas (AGlu51 y AGlu68). Aunque la acumulación de AGlu51 se mantuvo en niveles similares a lo largo de la maduración tanto en frutos tratados como no tratados, la inducción de AGlu68 fue exclusiva en aquellas chirimoyas a las que se aplicó el tratamiento gaseoso (Fig. 23). En lo que respecta a las isoenzimas constitutivas, tanto las intensidades de las bandas de AGlu36 como de AGlu75 disminuyeron notablemente en frutos madurados en aire a

20 °C. Este descenso es especialmente marcado en el caso de AGlu36, manteniéndose su intensidad en niveles en torno al 25 % del estado inicial. Por otro lado, al final del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂ provocó que la intensidad de las bandas de estas dos isoenzimas resultara prácticamente idéntica a la observada en los frutos recién recolectados (Fig. 24).

3.2.2.- Análisis de isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa básicas

Los anticuerpos anti-PR-Q reconocieron en los inmunoensayos de los extractos proteicos básicos de frutos recién recolectados cuatro bandas con una relativamente elevada masa molecular (≥ 40 kDa). Tres de estas isoenzimas quitinasas constitutivas básicas presentaron masas moleculares semejantes a sus homologas ácidas, BChi75, BChi43 y BChi40, teniendo la restante un valor intermedio, BChi56 (Fig. 25). En general, los niveles de estas isoenzimas experimentaron un drástico descenso en los frutos no tratados durante su conservación en frío (Fig. 26). Así, después de 3 días de conservación a 6 °C, la acumulación relativa de las bandas correspondientes a BChi75, BChi43 y BChi40 cayó a valores que oscilaron entre un 10-20 % con respecto a los descritos en los frutos recién recolectados. Una exposición prolongada a bajas temperaturas estuvo asociada con un mantenimiento de estos valores, exceptuando la acumulación puntual de la isoenzima BChi40 tras 9 días a 6 °C. Los valores de acumulación relativa de la isoenzima constitutiva BChi56 fueron indetectables a lo largo de la conservación en frío de los frutos no tratados. Por otro lado, se observó la inducción diferencial de una nueva isoenzima quitinasa, BChi33, después de 9 días a 6 °C, no detectándose esta banda en días anteriores o posteriores a este punto de conservación (Fig. 25).

La intensidad de las bandas correspondientes a las isoenzimas BChi75 y BChi40 en los frutos tratados con altas concentraciones de CO₂ después de 5 días de conservación a 6 °C fue significativamente mayor que en los frutos no tratados (Fig. 26). Sin embargo a partir de este día, estos niveles disminuyeron o se mantuvieron a niveles similares al de los frutos conservados en aire. En el caso de la banda correspondiente a la isoenzima BChi43, no se encontraron diferencias significativas con los frutos no tratados salvo al final del periodo de conservación (14 días), donde los valores de acumulación relativa fueron superiores. Asimismo, tampoco se detectaron niveles apreciables de la isoenzima BChi56 durante la conservación a 6 °C de los frutos tratados. Por último, en estas condiciones se observó la aparición de una nueva banda de baja masa molecular (BChi14) reconocida por los anticuerpos frente a PR-Q tras 9 días a 6 °C (Fig. 25). Esta última isoenzima también fue detectada después de 14 días a 6 °C en frutos tratados, aunque fue menor el nivel de acumulación.

En los extractos básicos del mesocarpo de frutos de chirimoya recién recolectados se detectó la inducción constitutiva de tres isoenzimas 1,3-β-glucanasas (BGlu76, BGlu52 y BGlu43) (Fig. 25). En los frutos no tratados, la conservación a 6 °C implicó una mayor acumulación relativa de la banda de BGlu76 hasta los 9 días, alcanzándose un valor 2,5 veces superior al detectado en el estado inicial. A continuación se produjo un fuerte descenso en la intensidad de esta banda, acabando el periodo de conservación en niveles que no presentaron

diferencias significativas con los de los frutos recién recolectados (Fig. 26). La pauta de evolución de la intensidad de BGlu52 fue, en cierto modo, opuesta a la descrita para la isoenzima anterior. Las bajas temperaturas tuvieron un efecto inmediato incrementando la acumulación relativa de esta banda, casi duplicando los valores de los frutos recién recolectados. A partir de este momento, los niveles descendieron a lo largo del periodo de conservación, principalmente tras 9 días a 6 °C, hasta valores casi indetectables después de 14 días. En la Figura 25 se observa como la inducción de la tercera isoenzima 1,3- β -glucanasa constitutiva (BGlu43) no se vio afectada, en líneas generales, por la conservación a bajas temperaturas.

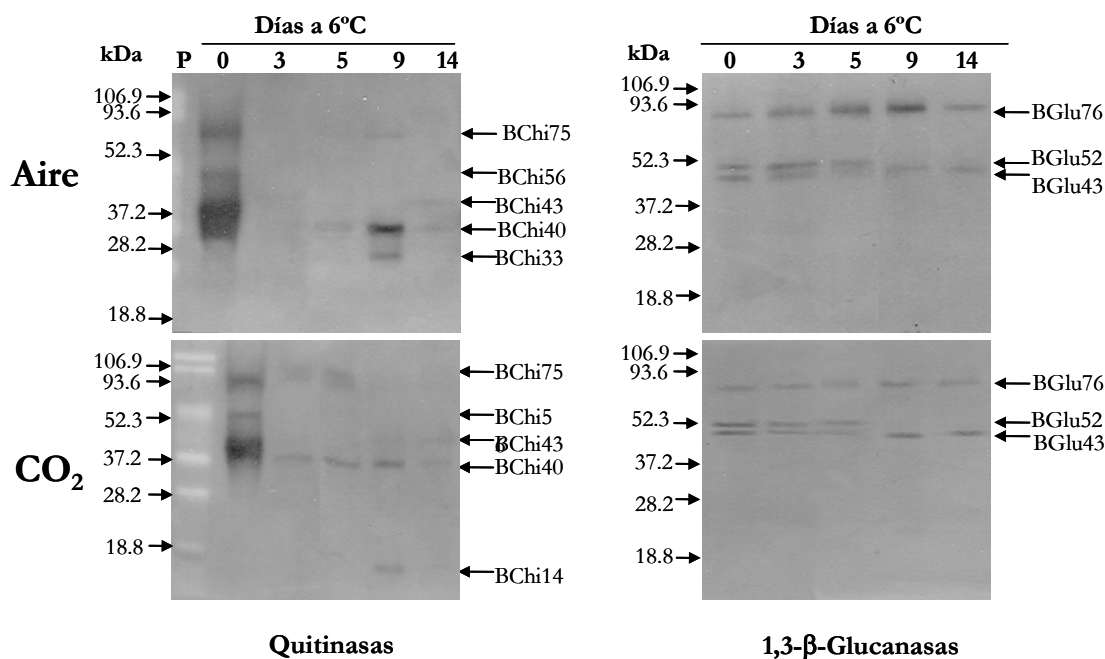


Figura 25. Detección mediante inmunoensayo de isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa básicas obtenidas de extractos del mesocarpo de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. Los extractos proteicos (5 μ g) fueron separados mediante SDS-PAGE (13,5 % poliacrilamida), electrotransferidos a membranas de PVDF y detectados con anticuerpos de tabaco frente a proteínas PR-Q (quitinasa) y PR-2 (1,3- β -glucanasa). Las flechas indican las masas moleculares de las proteínas patrón utilizadas. Carril P, patrón masas moleculares; carril 0, frutos recién recolectados; carril 3-14, días de conservación a 6 °C.

Los frutos pretratados con altas concentraciones de CO₂ a bajas temperaturas mostraron un patrón de evolución para la intensidad de las bandas de mayor masa molecular (BGlu76 y BGlu52) diferente al descrito para los frutos conservados en aire (Fig. 26). A lo largo del periodo de conservación los niveles de intensidad de la isoenzima BGlu76 oscilaron alrededor de los valores encontrados en los frutos recién recolectados, exceptuando el descenso significativo acontecido tras 5 días a 6 °C. En relación a los valores de acumulación relativa de la isoenzima BGlu52, estos disminuyeron progresivamente hasta alcanzar al final de la conservación valores casi indetectables, de un modo similar a los descritos para los frutos no tratados. No obstante, el nivel de partida (3 días) de los frutos tratados fue dos veces inferior al de los no tratados. Como en los frutos no tratados, el patrón de intensidad de la banda correspondiente a la isoenzima

BGlu43 no cambió durante el periodo de conservación a 6 °C (Fig. 26). Al contrario de la fracción ácida, no se observó la inducción de nuevas isoenzimas 1,3- β -glucanasa básicas (Fig. 25).

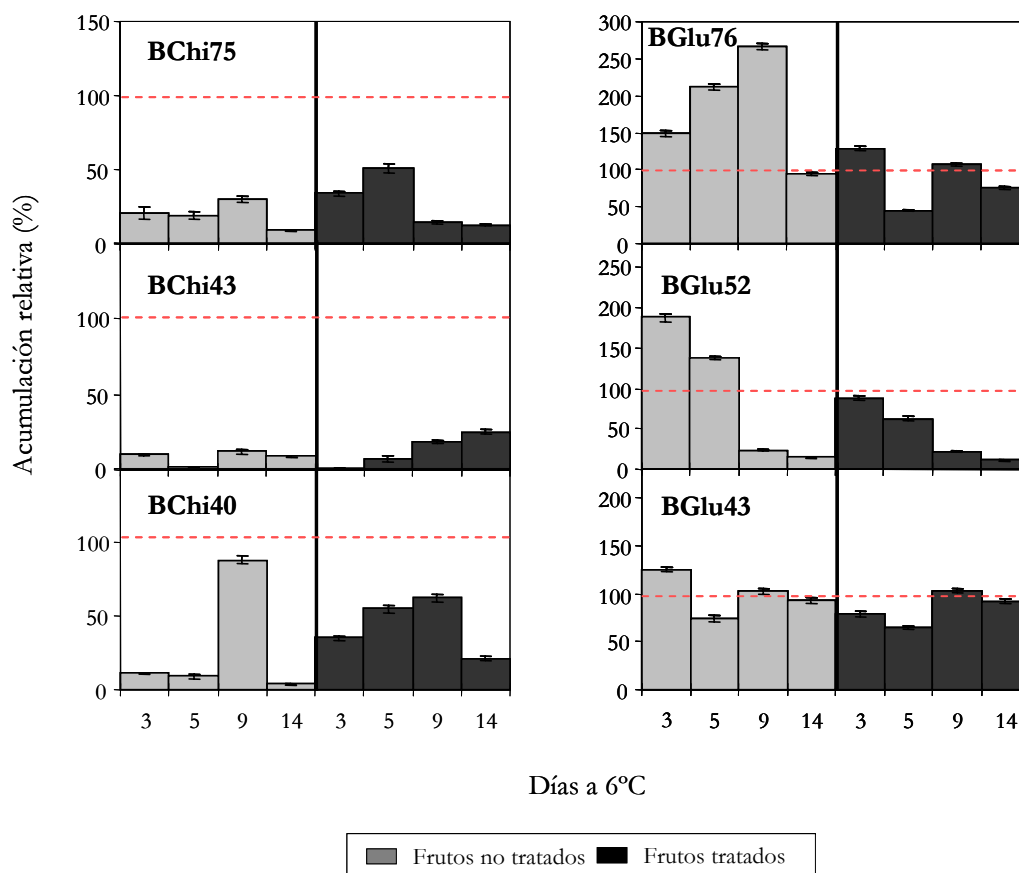


Figura 26. Intensidades de las bandas de isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa básicas constitutivas de extractos del mesocarpio de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. Los valores de densidad óptica fueron normalizados (100 %) con respecto a los obtenidos en los frutos recién recolectados (---). Cada valor corresponde a la media de dos determinaciones por escáner de 3 filmes de autoradiografía diferentes \pm DE. Se determinó la significancia estadística de los valores de una misma condición de conservación a lo largo del periodo de la misma mediante un análisis univarianza ANOVA con test LSD y $P \leq 0,05$.

El patrón de isoenzimas quitinasas básicas durante la maduración de los frutos no tratados a 20 °C presentó dos etapas claramente marcadas (Fig. 23). Transcurridas las primeras 24 horas, las bandas de las isoenzimas constitutivas se mantuvieron sin cambios aparentes en sus niveles de intensidad con respecto a los descritos en los frutos recién recolectados. Sin embargo, a partir del segundo día se detectó un perfil semejante al observado durante la conservación a 6 °C. En este sentido, las bandas de las isoenzimas BChi75, BChi56 y BChi43 mostraron niveles casi inapreciables durante la maduración a 20 °C, situándose en torno al 20 % del valor inicial al final del periodo de conservación. Aunque la banda correspondiente a BChi40 era aun visible, su intensidad también disminuyó significativamente ($P \leq 0,05$) con respecto a las primeras 48 horas (Fig. 27). En la Figura 22 también se muestra como el patrón del último día de maduración a 20 °C se asemejó al observado en frutos no tratados tras 9 días a 6 °C en lo que respecta a la inducción de la isoenzima BChi33. El tratamiento con altas concentraciones de CO₂ inhibió el

descenso de intensidad de las bandas de las isoenzimas quitinasas constitutivas observada en frutos madurando en aire (Fig. 23). En este sentido, no se observaron diferencias entre el perfil de isoenzimas de los frutos tratados y el de los recién recolectados. Las intensidades de estas cuatro bandas confirmaron este evento, puesto que sus niveles se encontraron en valores intermedios entre el estado inicial y el de 1 día a 20 °C de los frutos no tratados (Fig. 27).

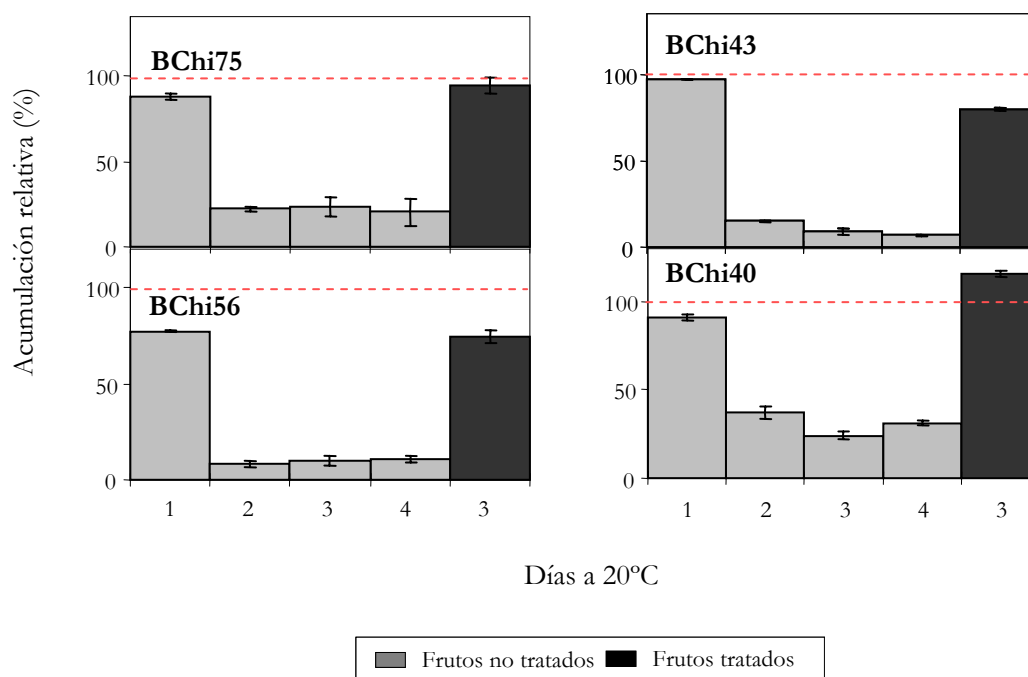


Figura 27. Intensidades de las bandas de isoenzimas quitinasa básicas constitutivas de extractos del mesocarpio de chirimoya durante la maduración a 20 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. Los valores de densidad óptica fueron normalizados (100 %) con respecto a los obtenidos en los frutos recién recolectados (---). Cada valor corresponde a la media de dos determinaciones por escáner de 3 filmes de autoradiografía diferentes \pm DE. Se determinó la significancia estadística de los valores a lo largo del periodo de conservación mediante un análisis univariante ANOVA con test LSD y $P \leq 0,05$.

Según se aprecia en la Figura 23, el efecto más destacable de la maduración a 20 °C en el patrón de isoenzimas 1,3- β -glucanasas básicas de los frutos no tratados fue la casi completa desaparición de la banda BGlu76 durante los tres primeros días de maduración. La pérdida de intensidad fue próxima al 80 % respecto a frutos recién recolectados, con un aumento significativo al final del periodo de maduración (Fig. 28). El tratamiento gaseoso mantuvo el patrón de isoenzimas similar al de frutos recién recolectados, sin embargo, se observó un importante cambio cuantitativo en el perfil de la isoenzima BGlu52 con respecto al estado inicial. Además, las intensidades de las bandas correspondientes a BGlu76, BGlu52 y BGlu43 fueron superiores que las de los frutos no tratados de la misma edad cronológica (Fig. 28).

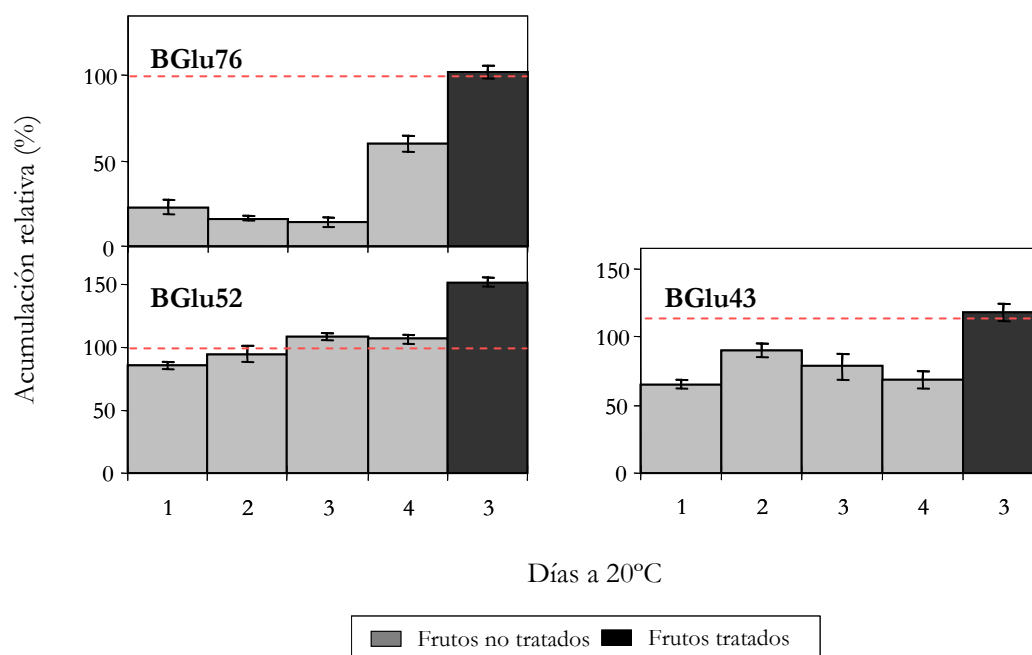


Figura 28. Intensidades de las bandas de isoenzimas 1,3- β -glucanasa básicas constitutivas de extractos del mesocarpio de chirimoya durante la maduración a 20 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. Los valores de densidad óptica fueron normalizados (100 %) con respecto a los obtenidos en los frutos recién recolectados (---). Cada valor corresponde a la media de dos determinaciones por escáner de 3 filmes de autoradiografía diferentes \pm DE. Se determinó la significancia estadística de los valores a lo largo del periodo de conservación mediante un análisis univarianza ANOVA con test LSD y $P \leq 0,05$.

4.- Purificación de isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa en chirimoya

A la vista de los resultados del apartado anterior, es interesante resaltar que la inducción diferencial de ciertas isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa en el mesocarpo de chirimoyas conservadas a bajas temperaturas y en aquellas tratadas con altas concentraciones de CO₂, puede resultar especialmente esclarecedora a la hora de caracterizar las respuestas de defensa del fruto frente al estrés por bajas temperaturas. Con el fin de dilucidar la participación de estas enzimas y su posible mecanismo de actuación en este proceso, se llevó a cabo una purificación y caracterización exhaustiva de cinco isoenzimas quitinasa (AChi48, AChi26, AChi24, BChi33, BChi14) y una isoenzima 1,3- β -glucanasa (AGlu19).

4.1.- Extracción y precipitación de proteínas

La extracción y purificación eficiente de enzimas del pericarpo de los frutos continúa siendo problemática debido a la confluencia de una serie de factores como la baja concentración de proteínas, la abundancia de proteasas en estos tejidos o la presencia de compuestos que interfieren seriamente en la estabilidad, aislamiento y análisis de las enzimas. Dentro de éstos, encontramos fragmentos de la pared celular, polisacáridos de almacenamiento, ácidos orgánicos, lípidos, compuestos fenólicos y un amplio abanico de metabolitos secundarios (Gegenheimer, 1990). Así mismo, hay que tener en cuenta que muchos de estos compuestos son productos secundarios que se acumulan en la vacuola de las células de la planta, y que son liberados al romperse este orgánulo durante el proceso de extracción. En este sentido, Saravanan y Rose (2004) han analizado la problemática de la extracción de proteínas en frutos bajo diferentes grados de desarrollo. En este estudio, se constató que el aislamiento de proteínas en frutos que se encuentran inmersos en el proceso de maduración presentaba un rendimiento menor que en aquellos que son inmaduros. Así, los cambios que se producen en los polisacáridos asociados a la pared celular, destacando entre ellos la fuerte afinidad de las proteínas con las largas cadenas de pectinas polianiónicas mediante interacciones iónicas, sería la principal causa de este problema. En el caso de chirimoyas conservadas a bajas temperaturas, es conveniente señalar que aunque esta tecnología retrasa la maduración del fruto, se siguen produciendo alteraciones bioquímicas y fisiológicas en los carbohidratos que pueden dificultar la extracción y purificación de enzimas (Gutiérrez *et al.*, 1992). Si bien existen trabajos que describen el aislamiento de quitinasas y 1,3- β -glucanasas del pericarpo de diferentes frutos, no hemos podido encontrar en la bibliografía un protocolo adecuado para el mesocarpo de chirimoya que nos permita obtener un extracto libre de estos polisacáridos y con un alto rendimiento en la purificación. Por tanto, en este trabajo de investigación se ha desarrollado una metodología de extracción, ultrafiltración y precipitación selectiva que ha dado como resultado un concentrado de proteínas enriquecido en quitinasas y 1,3- β -glucanasas y con la ausencia de contaminantes e interferentes de naturaleza no proteica, siendo adecuado para ser purificado cromatográficamente (Fig. 9).

La utilización de un tampón de extracción con un pH moderadamente ácido nos permitió obtener un homogeneizado a partir del mesocarpo de chirimoya que presentaba actividad quitinasa y 1,3- β -glucanasa y con una relativamente baja concentración de proteínas. Este hecho que *a priori* puede resultar contradictorio con lo expuesto anteriormente, tiene su explicación en la solubilidad y estabilidad de este tipo de proteínas a pH moderadamente bajos. Puesto que un significativo porcentaje de las proteínas del tejido precipitan en estas condiciones, el establecimiento de un medio ácido procuró un aumento en la selectividad del proceso de purificación. Aunque en este tipo de purificaciones es habitual utilizar elevadas relaciones de volúmenes de tampón: tejido fresco (p. ej: 10: 1) para asegurar una mayor extracción de proteínas, la baja concentración de proteínas en esta clase de tejidos (entre 0,1 y 0,5 % por peso fresco; Laing y Christeller, 2004) hizo necesario reducir el volumen a menores proporciones (1,5: 1) para evitar una excesiva dilución de las proteínas en el extracto crudo.

Así mismo, fue necesaria la presencia de otros compuestos en el tampón de extracción. En el caso del EDTA, su participación radicó en la necesidad de preservar la actividad enzimática durante la purificación, ya que su capacidad quelante permite la eliminación de los cationes metálicos divalentes (Ca^{+2} , Mg^{+2}) de la solución, los cuales aceleran la formación de puentes disulfuro en las proteínas y son requeridos por determinadas proteasas endógenas de membrana. A su vez, la complejación de los cationes Ca^{+2} contribuyó a evitar la gelificación de la fracción poco esterificada de la pectina, disminuyendo la viscosidad del extracto crudo (Thakur *et al.*, 1997). El pardeamiento de los extractos debido a los polifenoles originados por la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en los tejidos de los frutos fue evitado con la adición de ácido ascórbico y PVPP. Esto permitió el correcto desarrollo de los ensayos de medida de actividad enzimática mediante espectrofotometría y evitó la unión de los polifenoles a las proteínas, inactivándolas (Spencer *et al.*, 1988). La utilización de PVPP resultó muy útil debido a su conocida capacidad para adsorber la mayor parte de los compuestos fenólicos y su baja afinidad por las proteínas solubilizadas en los extractos (Cantarelli *et al.* 1989; Gokmen *et al.* 2001). Así mismo, el ácido ascórbico añadido incorporó al tampón de extracción unas condiciones moderadamente reductoras, lo cual es esencial en el mantenimiento del estado reducido de los grupos sulfhidrilo libres de las enzimas.

Puesto que la mayor parte de las pectinas de los tejidos vegetales presentan masas moleculares superiores a 150.000 MW (Thakur *et al.* 1997), la eliminación de este compuesto, y de otros polisacáridos de gran tamaño solubles en agua, se consiguió mayoritariamente con la aplicación posterior de una etapa de ultrafiltración utilizando una membrana que presentaba un tamaño de poro de 100.000 MW. Los datos de actividad específica de las tablas de purificación de las diferentes isoenzimas (Tabla 7-11) nos permitieron evaluar la eficacia de este paso. Dentro del material retenido en las membranas de 100.000 MW, se encontraba un alto porcentaje de las proteínas totales del extracto crudo (66-84 %), lo que permitió obtener elevados factores de purificación (2,62-5,06). Sin embargo, el elevado rendimiento (87,18-92,63 %; Tablas 7-10) observado en el aislamiento de isoenzimas quitinasa, contrastó con los valores de la purificación de la enzima 1,3- β -glucanasa (44 %; Tabla 11). Aunque las causas de este bajo rendimiento no

están del todo claras, creemos que dos factores pudieron influir de forma determinante. Uno de ellos puede encontrarse en una anormalmente alta afinidad de esta enzima por los hidrocoloides del material retenido, y otro en la metodología llevada a cabo en la determinación espectrofotométrica de la actividad 1,3- β -glucanasa en el extracto crudo. Hay que tener en cuenta que este extracto crudo presentaba grandes cantidades de azúcares endógenos, lo cual interfería de forma notable en la determinación de azúcares reductores procedentes de la hidrólisis de laminarina. Con objeto de eliminar estos contaminantes, se pasó 2 mL de las muestras a través de una columna de desalado 10DG (Bio-Rad, EE.UU.). Sin embargo, es posible que parte de estos azúcares eluyeran con las proteínas, generando una cierta sobrevaloración de la actividad 1,3- β -glucanasa total del extracto crudo.

La precipitación fraccionada se utiliza frecuentemente en las purificaciones a media escala con el objeto de eliminar las impurezas más groseras como, por ejemplo, fragmentos de la pared y membrana celular o partículas precipitadas no retenidas mediante la ultrafiltración. El método más común es la precipitación con sulfato amónico, el cual discrimina entre las diferentes macromoléculas en función de su grado de hidrofobicidad. En esta etapa debe ponerse un especial cuidado a la hora de reducir al mínimo la destrucción de la actividad enzimática por exposición a la elevada fuerza iónica del medio. Por ello hay que añadir los cristales de esta sal de un modo gradual, evitando concentraciones locales elevadas. El extracto obtenido en la etapa de ultrafiltración se sometió a un fraccionamiento con sulfato amónico por saturación en dos pasos. En primer lugar, con 20 % de saturación, con lo que precipitan fundamentalmente aquellos componentes donde las interacciones hidrofóbicas son más acusadas (lípidos y proteínas de membrana) o de muy elevada masa molecular. La fracción soluble separada, que contenía la mayor parte de la actividad enzimática quitinasa y 1,3- β -glucanasa, se llevó de nuevo a saturación con un 85 % de concentración, obteniéndose un precipitado de proteínas. Como en el paso anterior, tanto el rendimiento como el valor del factor de purificación después de la obtención de este precipitado presentó grandes diferencias entre la purificación de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa (Tablas 7-11). En las primeras osciló entre 72,36-73,34 % y 3.30-4.92 respectivamente. En el caso del aislamiento de AGlu19 el rendimiento fue un 28,36 %, con un factor de purificación de 2,13. Sin embargo, teniendo en cuenta que la actividad quitinasa y 1,3- β -glucanasa del precipitado suponía entre 65 y 80 % de la actividad de la etapa de ultrafiltración (Tablas 7-11), no parece que esta etapa de fraccionamiento afecte del mismo modo adverso en el rendimiento de la purificación de la isoenzima AGlu19 que el paso de ultrafiltración.

4.2.- Aislamiento de isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa mediante cromatografía líquida

A continuación se describen los resultados obtenidos en la secuencia de cromatografías a la que se sometió a los extractos obtenidos después de la precipitación con sulfato de amonio hasta la purificación de las cinco isoenzimas quitinasa y una isoenzima 1,3- β -glucanasa (Fig. 9).

4.2.1.- AChi48 y AChi24

Se utilizaron tres pasos cromatográficos para la purificación a homogeneidad de estas dos isoenzimas quitinasa a partir de 250 g de mesocarpio de frutos pretratados con altas concentraciones de CO_2 y conservados 9 días a 6 °C. En la primera cromatografía por intercambio aniónico en una columna Mono-Q a pH 8,0, se retuvieron ambas isoenzimas ácidas, las cuales fueron eluidas con un gradiente de NaCl en un rango de concentración 0-1 M (Fig. 30). El intervalo de fracciones (8-16) correspondiente al pico con actividad quitinolítica, en un rango de 0,08-0,595 M de NaCl, fue recogido y desalado antes de ser aplicado a la columna de afinidad de quitina. Como queda reflejado en la Tabla 7, la mayor parte de las proteínas de la fracción ácida procedente de la etapa anterior eluyeron isocráticamente durante la carga y posterior lavado de la columna de quitina con tampón de acetato sódico 20 mM, pH 5,5. Sin embargo, aunque las proteínas retenidas, eluidas posteriormente con 2 L de NaCl 2M, representaron únicamente el 19,7 % del contenido total, contenían el 77 % de la actividad quitinasa total de la fracción.

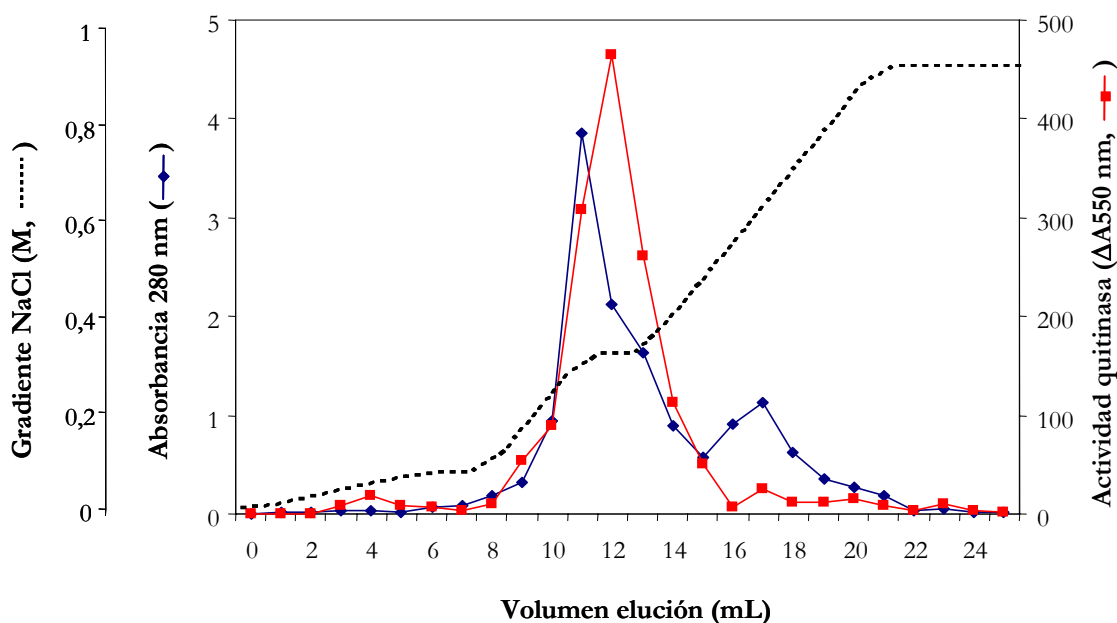


Figura 30. Perfil de elución mediante cromatografía de intercambio aniónico de la retención de proteínas (—●—) y de la actividad quitinasa (—■—) de un extracto del mesocarpio de chirimoyas pretratadas con altas concentraciones de CO_2 y conservadas 9 días a 6 °C. Las muestras fueron preparadas como se describe en el apartado de *Material y métodos* y aplicadas en una columna Mono-Q HR 5/5. Las proteínas fueron eluidas con 25 mL de un gradiente de NaCl (.....). La actividad enzimática de cada fracción fue determinada de acuerdo a las condiciones estándar.

Por último, la fracción eluida de la columna de quitina fue cargada en una columna de intercambio aniónico Mono-Q HR 5/5, en las mismas condiciones experimentales que la primera separación cromatográfica (Fig. 31). Dentro del pico que contenía la mayor actividad enzimática quitinasa se purificaron las isoenzimas AChi48 y AChi24 en fracciones consecutivas. La primera en ser detectada fue AChi24, eluida con 0,305 M de NaCl en la fracción 12, eluyendo en la siguiente fracción la isoenzima AChi48 con 0,35 M de NaCl. Tras analizar la pureza de estas fracciones mediante electroforesis SDS-PAGE, los resultados indicaron que estas dos fracciones

activas eran homogéneas al observarse una banda única en los respectivos geles que presentaban unas masas moleculares aparentes de 48,5 y 24,1 kDa (Fig. 31). En el todo el proceso de aislamiento, las isoenzimas AChi48 y AChi24 fueron purificadas aproximadamente 54 y 42 veces, respectivamente. A efectos prácticos, esta purificación significó la obtención de 230 y 360 μg de AChi48 y AChi24, lo que representaba un 0,12 % y un 0,18 % de la cantidad total de proteínas del extracto crudo, así como un 6,35 % y un 7,76 % de la actividad total inicial, respectivamente (Tabla 7).

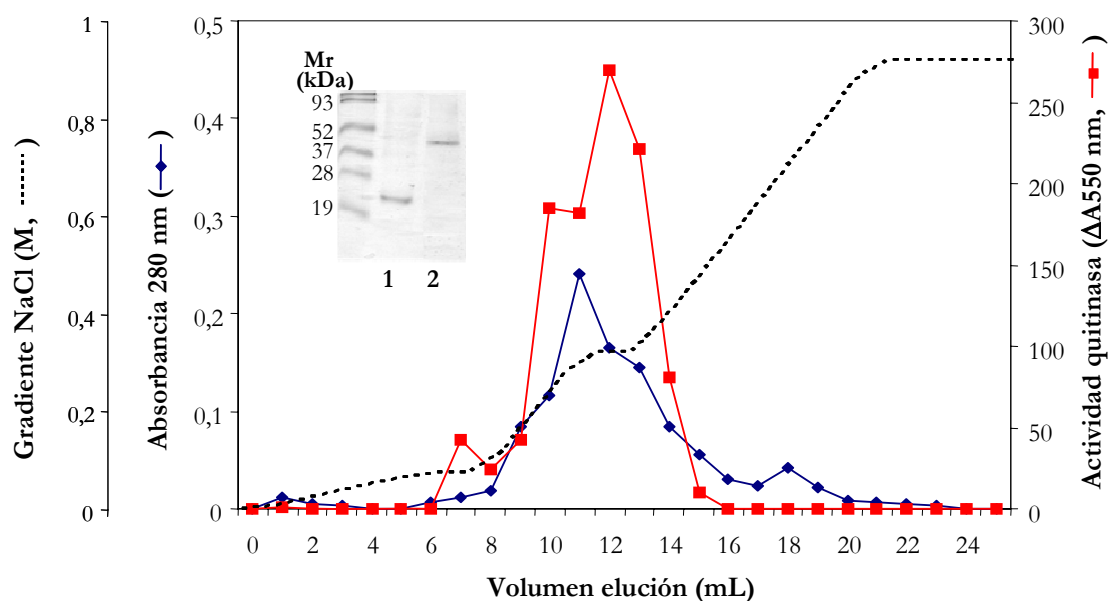


Figura 31. Perfil de elución mediante cromatografía de intercambio aniónico de la retención de proteínas (—♦—) y de la actividad quitinasa (—■—) de la fracción eluida de la columna de quitina. Las muestras de mesocarpio de chirimoyas pretratadas con altas concentraciones de CO_2 y conservadas 9 días a 6°C fueron preparadas como se describe en el apartado de *Material y métodos* y aplicadas en una columna Mono-Q HR 5/5. Las proteínas fueron eluidas con 25 mL de un gradiente de NaCl (·····). **Figura interior:** Patrón SDS-PAGE de las fracciones 12 (carril 1) y 13 (carril 2). La actividad enzimática de cada fracción fue determinada de acuerdo a las condiciones estándar.

4.2.2.- AChi26

La proteína precipitada con un 85 % de saturación de sulfato de amonio procedente de 150 g de mesocarpio de chirimoyas conservadas 5 días a 6°C fue disuelta y desalada antes de someterla a una secuencia de etapas cromatográficas que dieron como resultado la obtención de una isoenzima ácida de quitinasa, AChi26, que mostraba pureza electroforética. Primero se procedió a obtener la fracción ácida mediante la aplicación de una cromatografía de intercambio aniónico, tal y como se describe para las dos isoenzimas quitinasas ácidas anteriores. Tras el estudio del perfil cromatográfico, se procedió a reunir las fracciones activas (8-17) que habían eluido en un rango de concentraciones de NaCl que oscilaba entre 0,08 y 0,685 M de NaCl (Fig. 32)

Tabla 7. Purificación de AChi48 y AChi24 a partir de mesocarpio de chirimoyas pretratadas con altas concentraciones de CO₂ y conservadas 9 días a 6 °C

Fracción	Proteína total (mg)	Actividad total (U) ^x	Actividad específica (U · mg ⁻¹)	Recuperación (%) ^y	Factor de purificación ^z
Extracto crudo	197,34	18846	95,50	100,00	1,00
Ultrafiltración	40,56	17457	430,56	92,63	4,51
Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ 20-85 %	32,05	13783	430,09	73,13	4,50
Mono-Q HR 5/5 pH 8.0	21,13	8286	392,11	43,96	4,11
Columna quitina	4,17	6375	1529,18	33,83	16,01
Mono-Q HR 5/5 pH 8.0					
AChi48	0,23	1196	5146,13	6,35	53,88
AChi24	0,36	1463	4059,81	7,76	42,48

^x Los datos de actividad corresponden a unidades de actividad ($\Delta A_{550} \cdot \text{mmol} \cdot \text{min}^{-1}$) frente a CM-Chitin-RBV a pH 5 y 37 °C.

^y Expresada en porcentaje de unidades de actividad enzimática.

^z Calculado mediante los valores de actividad específica (U · mg⁻¹ de proteína).

Esta fracción proteica fue purificada mediante una columna de cromatoforfoque Mono-P HR 5/20 con la aplicación de un gradiente de pH 6-4. En el perfil de elución, se detectó la presencia de tres picos anchos con actividad quitinasa según se acidificaba el pH en la columna (Fig. 33). Se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE e inmunoensayo las tres fracciones con máxima actividad quitinolítica de estos picos (fracciones 15, 20 y 31), y que presentaban unos valores de pH de 5,57, 5,03 y 4,09 unidades respectivamente. En base a los perfiles observados, se seleccionó el intervalo de fracciones (29-32) que representaba el pico con un pH más ácido. Una vez desalada esta fracción, fue recromatografiada en la misma columna con la aplicación de un gradiente de pH 5-4 más estrecho. En el análisis del cromatograma de esta etapa se observó la presencia de un único pico con actividad quitinasa con un pI de 4,05. Se analizó la pureza de la fracción 39 mediante electroforesis SDS-PAGE, detectando la presencia de una única banda intensa en el gel teñido con azul de Coomassie, que presentaba una masa molecular aparente de 25,8 kDa (Fig. 33). La purificación homogénea de la isoenzima AChi26 presentó un factor de purificación de 17,76. Se obtuvieron 190 µg de enzima a partir del material vegetal de partida, lo que representa un 9,01 % de la actividad total inicial y un 0,16 % de la cantidad total de proteínas inicial (Tabla 8).

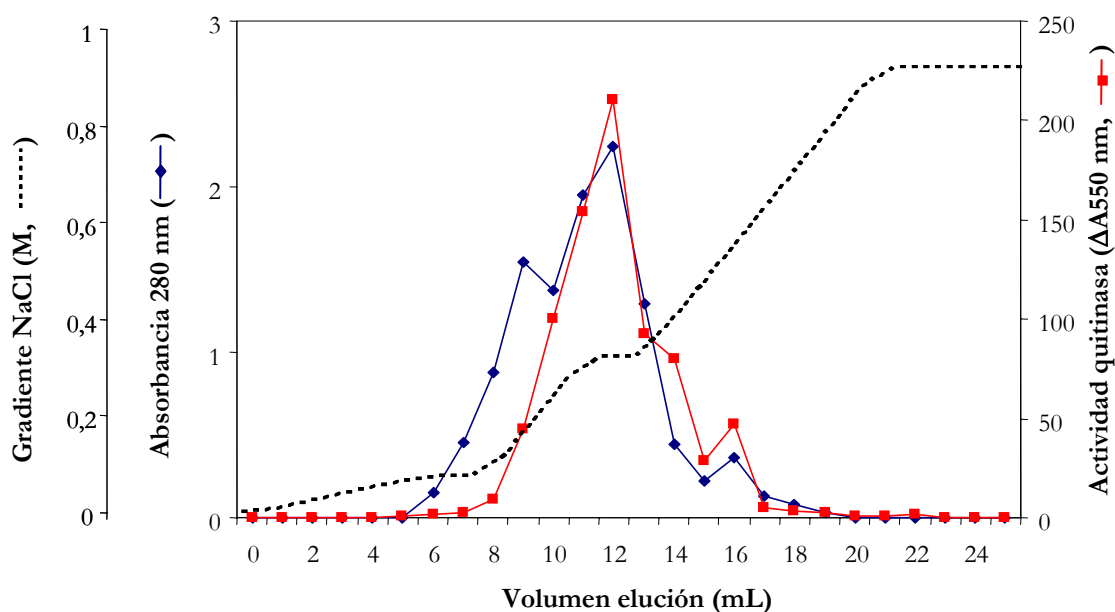


Figura 32. Perfil de elución mediante cromatografía de intercambio aniónico de la retención de proteínas (—♦—) y de la actividad quitinasa (—■—) de un extracto del mesocarpio de chirimoyas conservadas 5 días a 6 °C. Las muestras fueron preparadas como se describe en el apartado de *Material y métodos* y aplicadas en una columna Mono-Q HR 5/5. Las proteínas fueron eluidas con 25 mL de un gradiente de NaCl (.....). La actividad enzimática de cada fracción fue determinada de acuerdo a las condiciones estándar.

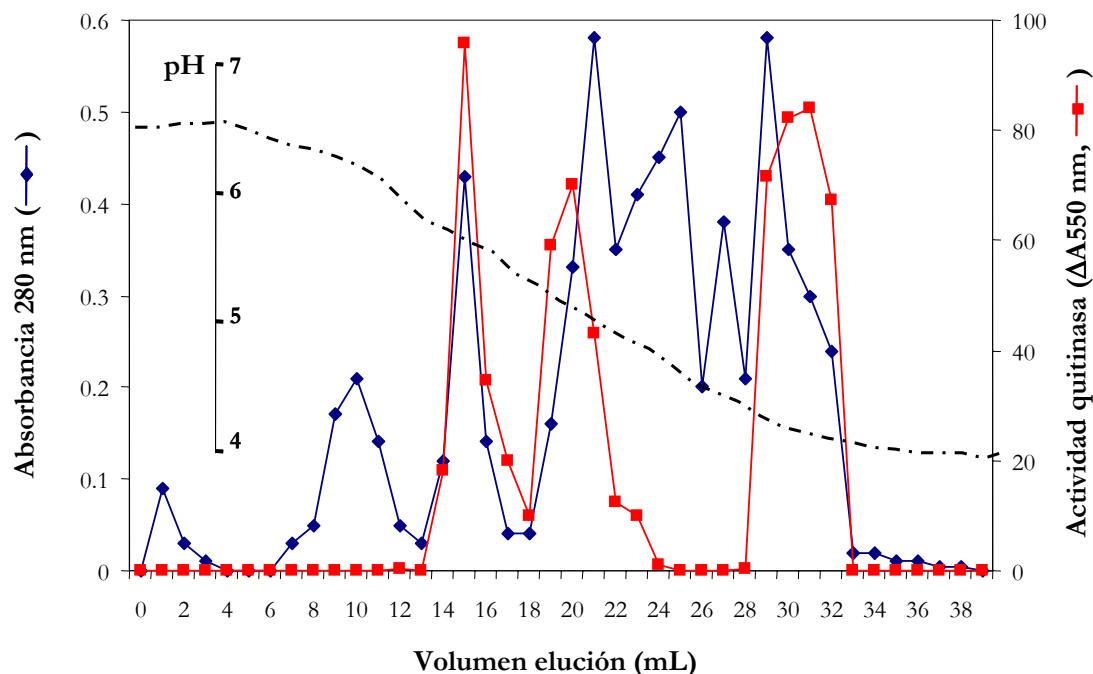


Figura 33. Perfil de elución mediante cromatografía de enfoque de pH (pH 6-4) de la retención de proteínas (—♦—) y de la actividad quitinasa (—■—) de la fracción ácida del mesocarpio de chirimoyas conservadas 5 días a 6 °C. Las muestras fueron preparadas como se describe en el apartado de *Material y métodos* y aplicadas en una columna Mono-P HR 5/20. Las proteínas fueron eluidas con 39 mL de un gradiente de pH (.....). La actividad enzimática de cada fracción fue determinada de acuerdo a las condiciones estándar.

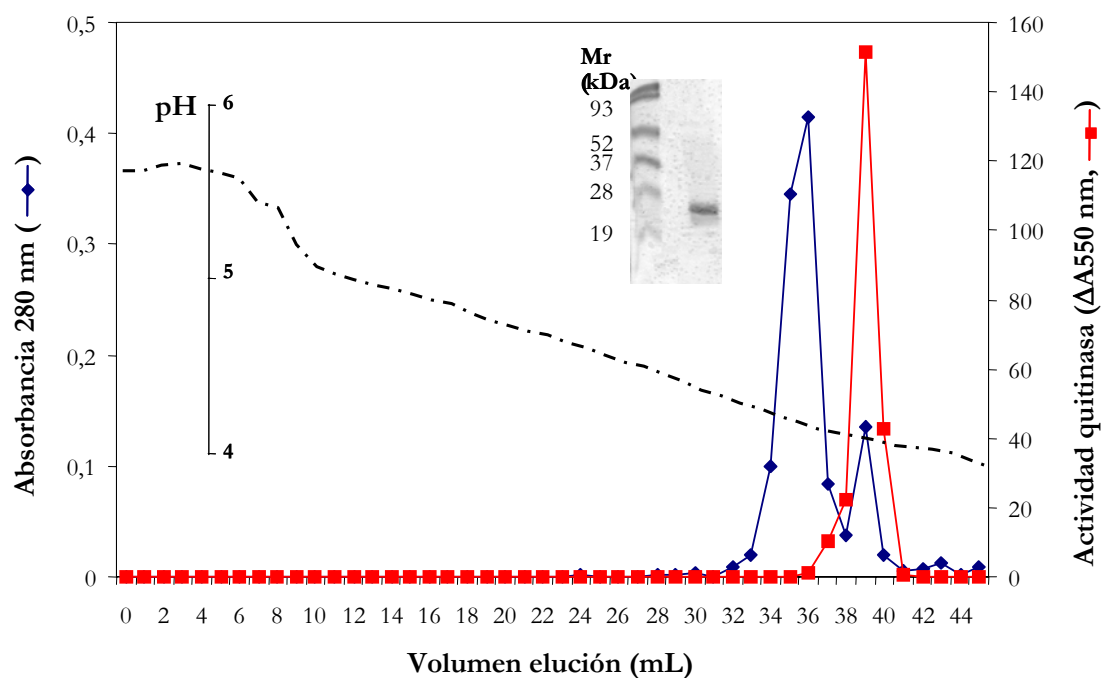


Figura 34. Perfil de elución mediante cromatoenfoco (pH 5-4) de la retención de proteínas (—◆—) y de la actividad quitinasa (—■—) de las fracciones 29-32 eluidas en un gradiente de pH 6-4. El extracto proteico procedente del mesocarpio de chirimoyas conservadas 5 días a 6 °C fueron preparadas como se describe en el apartado de *Material y métodos* y aplicadas en una columna Mono-P HR 5/20. Las proteínas fueron eluidas con 45 mL de un gradiente de pH (.....). **Figura interior:** Patrón SDS-PAGE de la fracción 39. La actividad enzimática de cada fracción fue determinada de acuerdo a las condiciones estándar.

Tabla 8. Purificación de AChi26 a partir de mesocarpio de chirimoyas conservadas 5 días a 6 °C

Fracción	Proteína total (mg)	Actividad total (U) ^x	Actividad específica (U · mg ⁻¹)	Recuperación (%) ^y	Factor de purificación ^z
Extracto crudo	119,09	9467	79,49	100,00	1,00
Ultrafiltración	20,54	8253	401,88	87,18	5,06
Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ 20-85 %	17,53	6850	390,78	72,36	4,92
Mono-Q HR 5/5 pH 8.0	12,73	4524	355,38	47,79	4,47
Mono-P HR 5/20 pH 6-4	2,18	1707	781,76	18,03	9,83
Mono-P HR 5/20 pH 5-4	0,19	853	4556,96	9,01	57,33

^x Los datos de actividad corresponden a unidades de actividad total ($\Delta A_{550} \cdot \text{mmol} \cdot \text{min}^{-1}$) frente a CM-Chitin-RBV a pH 5 y 37 °C.

^y Expresada en porcentaje de unidades de actividad enzimática.

^z Calculado mediante los valores de actividad específica (U · mg⁻¹ de proteína).

4.2.3.- BChi33

En la purificación de esta isoenzima quitinasa básica se utilizaron 150 g de mesocarpio de chirimoyas conservadas 9 días a 6 °C. Una vez desalada la fracción proteica precipitada con sulfato de amonio al 85 %, ésta fue fraccionada mediante una cromatografía de intercambio aniónico en una columna Mono-Q HR 5/5 a pH 8,0. Se recogió la fracción no retenida en la columna, o fracción básica, que aunque contenía únicamente el 18 % de las proteínas totales, representaba cerca del 40 % de actividad quitinasa total (Tabla 9).

Esta fracción fue separada posteriormente mediante su aplicación sobre una columna Mono-P HR 5/20, desarrollando un gradiente lineal de pH 9-7. En el perfil de elución que muestra la Figura 35, destaca la presencia de un único pico con actividad quitinasa ligeramente desplazado de uno de los picos de concentración de proteínas y que eluia en un intervalo de pH que variaba entre 9,09 y 8,28 unidades. Se agruparon las fracciones 8, 9, 10, que presentaban el 71 % de la actividad total quitinasa de la fracción básica (Tabla 9), y se purificaron de nuevo a través de otro paso de cromatofoco con un gradiente de pH 9-8. La undécima fracción eluida a través de la columna coincidió con el máximo de actividad quitinasa y con el pico de concentración de proteínas del cromatograma, presentando un pH de 8,93 (Fig. 36). El desarrollo de una electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras de la fracción 11, mostró la presencia de una única banda en el gel con una masa molecular aparente de 33,0 kDa (Fig. 36). El rendimiento final de la purificación de la isoenzima BChi33 fue de 17,56 %, considerablemente mayor que el obtenido para las otras isoenzimas quitinasas, con un factor de purificación de 64,6. La cantidad de enzima purificada con este protocolo fue de 320 µg, que implica un 0,27 % de la cantidad total de proteínas de los frutos conservados 9 días a 6 °C (Tabla 9).

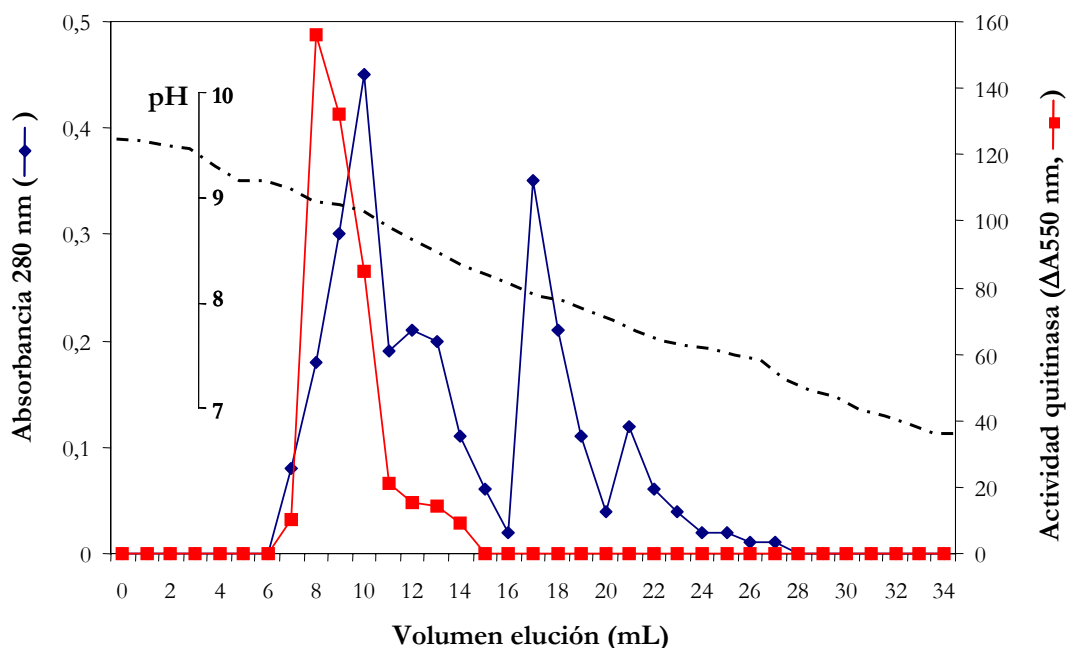


Figura 35. Perfil de elución mediante cromatofoco (pH 9-7) de la retención de proteínas (—◆—) y de la actividad quitinasa (—■—) de la fracción básica del mesocarpio de chirimoyas conservadas 9 días a 6 °C. Las muestras fueron preparadas como se describe en el apartado de *Material y métodos* y aplicadas en una columna Mono-P HR 5/20. Las proteínas fueron eluidas con 34 mL de un gradiente de pH (.....). La actividad enzimática de cada fracción fue determinada de acuerdo a las condiciones estándar.

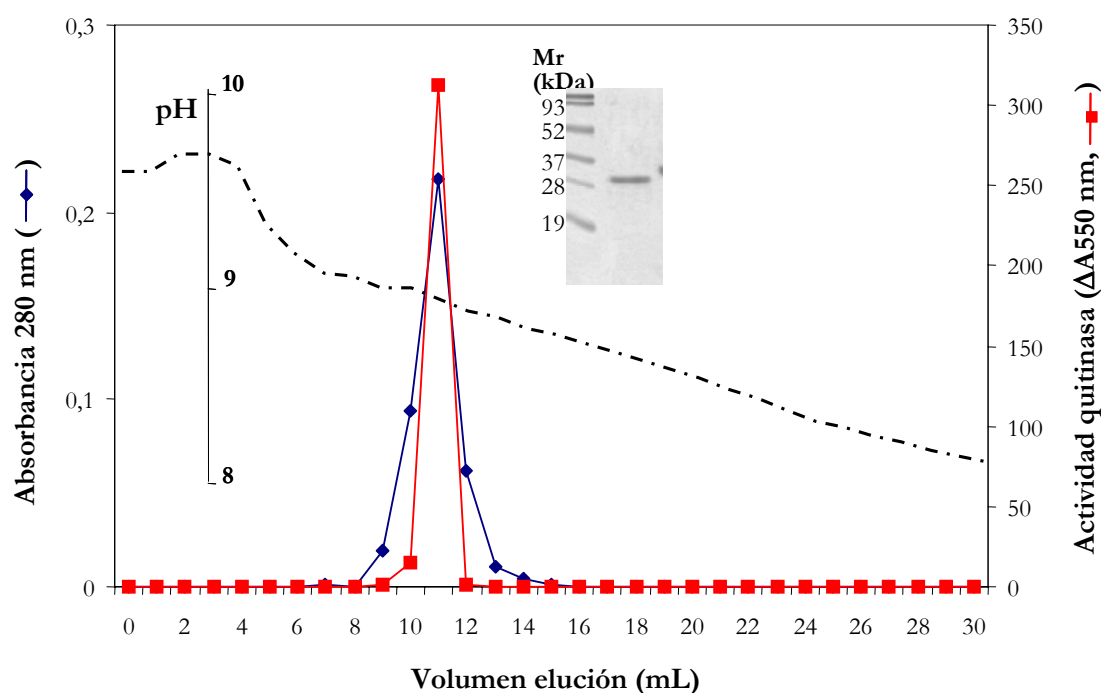


Figura 36. Perfil de elución mediante cromatoenfoco (pH 9-8) de la retención de proteínas (—◆—) y de la actividad quitinasa (—■—) de las fracciones 8-10 eluidas en un gradiente de pH 9-7. El extracto proteico procedente del mesocarpio de chirimoyas conservadas 9 días a 6 °C fueron preparadas como se describe en el apartado de *Material y métodos* y aplicadas en una columna Mono-P HR 5/20. Las proteínas fueron eluidas con 30 mL de un gradiente de pH (·····). **Figura interior:** Patrón SDS-PAGE de la fracción 11. La actividad enzimática de cada fracción fue determinada de acuerdo a las condiciones estándar.

Tabla 9. Purificación de BChi33 a partir de mesocarpio de chirimoyas conservadas 9 días a 6 °C

Fracción	Proteína total (mg)	Actividad total (U) ^y	Actividad específica (U · mg ⁻¹)	Recuperación (%) ^z	Factor de purificación ^a
Extracto crudo	116,86	10066	86,14	100,00	1,00
Ultrafiltración	39,60	8933	225,58	88,75	2,62
Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ 20-85 %	25,96	7382	284,36	73,34	3,30
Mono-Q HR 5/5 pH 8.0 ^x	4,77	2942	617,09	29,23	7,16
Mono-P HR 5/20 pH 9-7	1,26	2102	1666,58	20,89	19,35
Mono-P HR 5/20 pH 9-8	0,32	1767	5565,03	17,56	64,60

^x Fracción correspondiente al volumen muerto.

^y Los datos de actividad corresponden a unidades de actividad total ($\Delta A_{550} \cdot \text{mmol} \cdot \text{min}^{-1}$) frente a CM-Chitin-RBV a pH 5 y 37 °C.

^z Expresada en porcentaje de unidades de actividad enzimática.

^a Calculado mediante los valores de actividad específica (U · mg⁻¹ de proteína).

4.2.4.- BChi14

A la vista del perfil de isoenzimas quitinasas básicas en frutos tratados y conservados a bajas temperaturas (Fig. 25), para la purificación de la isoenzima BChi14 se utilizó la fracción básica procedente de la primera cromatografía aniónica de la purificación de AChi48 y AChi24 (apartado 4.2.1). A pesar de que las proteínas de la fracción básica representaban un porcentaje minoritario del total obtenido en el precipitado con sulfato de amonio, se requirió la aplicación de una nueva etapa cromatográfica para la purificación a homogeneidad de BChi14 (Tabla 10).

Para la eliminación de los contaminantes de la fracción básica de frutos tratados y conservados 9 días a 6 °C, se aplicó el extracto en una columna Mono-P HR 5/20, desarrollando un gradiente de pH de 9-7. Tal y como se observa en la Figura 37, en el perfil de actividad quitinasa de las fracciones eluidas a través de la columna se halló la presencia de tres picos en un intervalo de pH moderadamente básicos (9,09-8,26) y que coincidía con el patrón de concentración de proteínas. Tras efectuar un análisis mediante SDS-PAGE de este conjunto de fracciones (7-16), se determinó en la fracción 15 la presencia de una banda correspondiente a la isoenzima BChi14 totalmente aislada de otras proteínas (Fig. 37). La masa molecular aparente de esta isoenzima fue de 14,5 kDa y presentó un pI de 8,26. Se obtuvieron 180 µg de esta isoenzima básica con un factor de purificación de 36,2. La actividad de la isoenzima BChi14 purificada sólo implicó el 3,29 % de la actividad quitinasa total, siendo el 0,09 % de la cantidad de proteínas totales de frutos tratados tras 9 días a 6 °C.

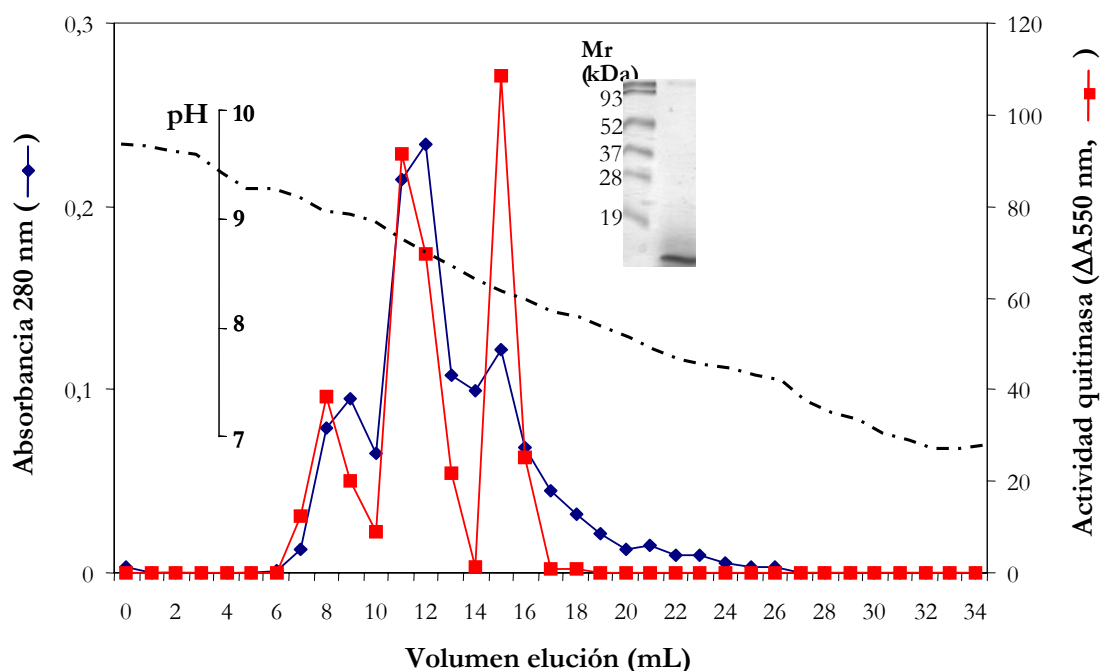


Figura 37. Perfil de elución mediante cromatoenfoco (pH 9-7) de la retención de proteínas (—◆—) y de la actividad quitinasa (—■—) de la fracción básica del mesocarpio de chirimoyas pretratadas con altas concentraciones de CO₂ y conservadas 9 días a 6 °C. Las muestras fueron preparadas como se describe en el apartado de *Material y métodos* y aplicadas en una columna Mono-P HR 5/20. Las proteínas fueron eluidas con 34 mL de un gradiente de pH (·····). **Figura interior:** Patrón SDS-PAGE de la fracción 15. La actividad enzimática de cada fracción fue determinada de acuerdo a las condiciones estándar.

Tabla 10. Purificación de BChi14 a partir de mesocarpio de chirimoyas pretratadas con altas concentraciones de CO₂ y conservadas 9 días a 6 °C

Fracción	Proteína total (mg)	Actividad total (U) ^y	Actividad específica (U · mg ⁻¹)	Recuperación (%) ^z	Factor de purificación ^a
Extracto crudo	197,34	18845	95,50	100,00	1,00
Ultrafiltración	40,55	17457	430,56	92,63	4,51
Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ 20-85 %	32,05	13782	430,09	73,13	4,50
Mono-Q HR 5/5 pH 8.0 ^x	2,21	3619	1637,30	19,20	17,14
Mono-P HR 5/20 pH 9-7	0,18	620	3458,27	3,29	36,21

^x Fracción correspondiente al volumen muerto.

^y Los datos de actividad corresponden a unidades de actividad total ($\Delta A_{550} \cdot \text{mmol} \cdot \text{min}^{-1}$) frente a CM-Chitin-RBV a pH 5 y 37 °C.

^z Expresada en porcentaje de unidades de actividad enzimática.

^a Calculado mediante los valores de actividad específica (U · mg⁻¹ de proteína).

4.2.5.- AGlu19

La isoenzima ácida 1,3- β -glucanasa AGlu19 fue purificada desde 150 g de una mezcla de tejidos de mesocarpio de chirimoya tratados con altas concentraciones de CO₂: 75 g procedentes de frutos conservados 3 días a 6 °C y otros 75 g de frutos conservados durante 9 días a 6 °C. Tal y como se describe en la sección de *Material y métodos*, la primera etapa del proceso de aislamiento de AGlu19 fue la obtención de la fracción ácida a partir del precipitado de sulfato de amonio mediante cromatografía de intercambio aniónico a pH 8,0. En el cromatograma de elución obtenido con un gradiente de NaCl 0-1 M se encontraron dos picos consecutivos de actividad 1,3- β -glucanasa, y que eluyeron con 0,08 M y 0,3 M de NaCl respectivamente (Fig. 38).

Las fracciones activas correspondientes al segundo pico (10 y 11) fueron desaladas y separadas conjuntamente en función del *pI* de sus proteínas en una columna Mono-P HR 5/20 (Fig. 39). Después de la elución de las proteínas mediante el desarrollo de un gradiente de pH 6-4, se seleccionó el intervalo de fracciones que englobaban el pico de actividad 1,3- β -glucanasa situado a un pH menos ácido (fracciones 15-18, pH = 5,57-5,24). Este pico fue cargado de nuevo en la misma columna y fraccionado con un gradiente de pH 6-5 (Fig. 40). La fracción 19, que contenía el mayor porcentaje de actividad 1,3- β -glucanasa del perfil de elución de esta etapa de cromatofoco, fue recogida y analizada mediante electroforesis SDS-PAGE. En la Figura 40 se muestra como la isoenzima AGlu19 fue purificada a homogeneidad, presentando una masa molecular aparente de 19,2 kDa y un *pI* de 5,25. El rendimiento global de la purificación fue de 1,35 %, con un factor de purificación de 17,76. Se obtuvieron 180 μ g de enzima purificada, es decir, un 0,07 % de la cantidad de proteínas del extracto crudo (Tabla 11).

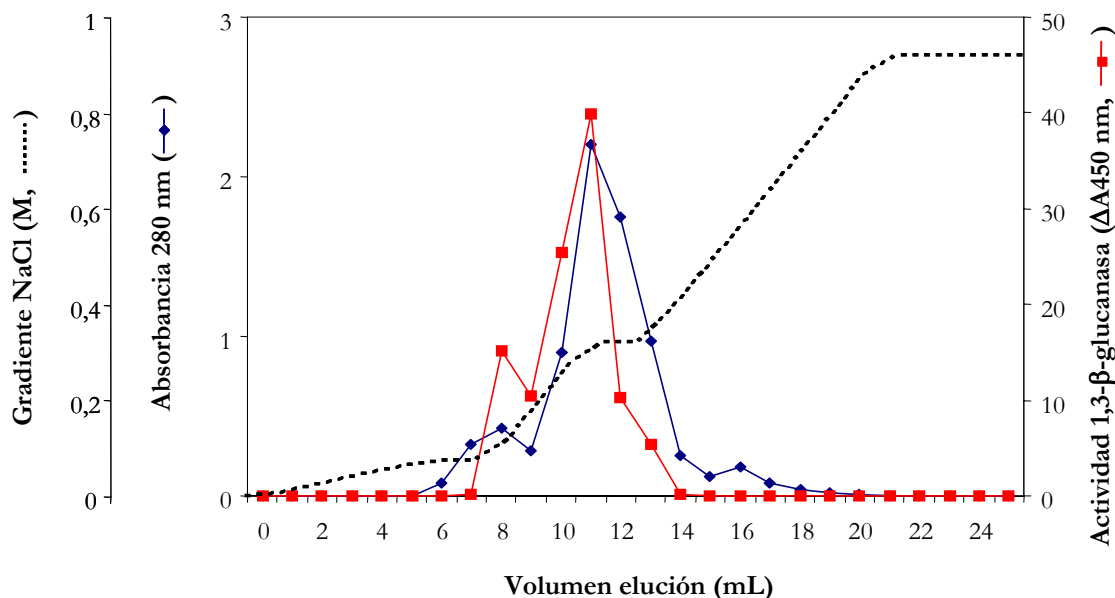


Figura 38. Perfil de elución mediante cromatografía de intercambio aniónico de la retención de proteínas (—◆—) y de la actividad 1,3-β-glucanasa (—■—) de un extracto del mesocarpio de chirimoyas pretratadas con altas concentraciones de CO₂ y conservadas 9 días a 6 °C. Las muestras fueron preparadas como se describe en el apartado de *Material y métodos* y aplicadas en una columna Mono-Q HR 5/5. Las proteínas fueron eluidas con 25 mL de un gradiente de NaCl (.....). La actividad enzimática de cada fracción fue determinada de acuerdo a las condiciones estandar.

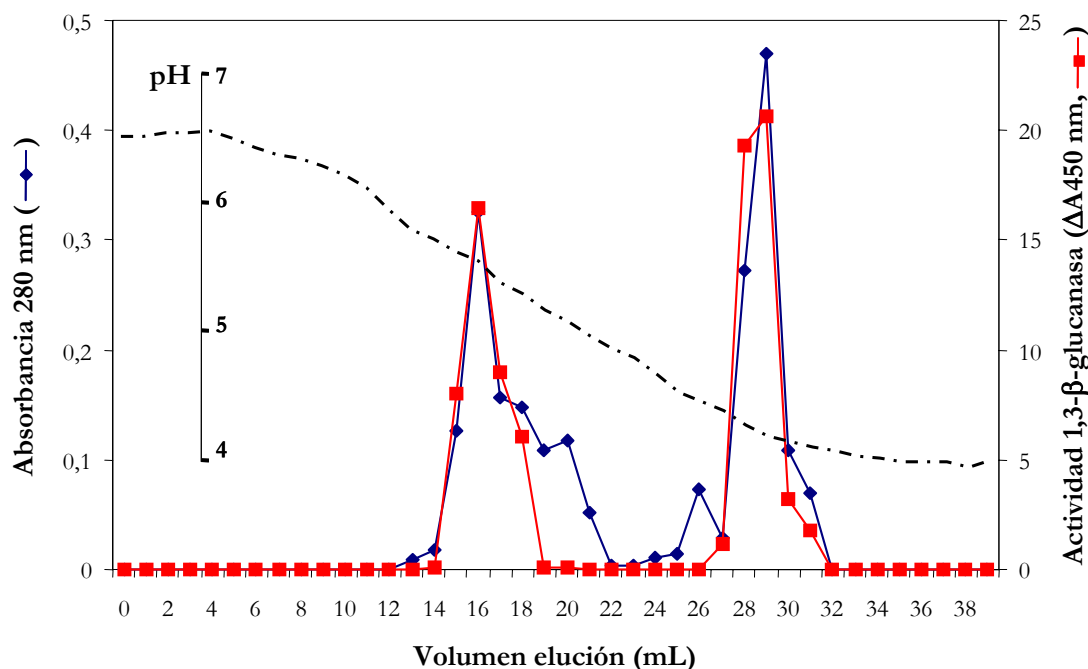


Figura 39. Perfil de elución mediante cromatografía de enfoque de pH (pH 6-4) de la retención de proteínas (—◆—) y de la actividad 1,3-β-glucanasa (—■—) de las fracciones 10-11 de la fracción ácida del mesocarpio de chirimoyas pretratadas con altas concentraciones de CO₂ y conservadas 9 días a 6 °C. Las muestras fueron preparadas como se describe en el apartado de *Material y métodos* y aplicadas en una columna Mono-P HR 5/20. Las proteínas fueron eluidas con 39 mL de un gradiente de pH (.....). La actividad enzimática de cada fracción fue determinada de acuerdo a las condiciones estandar.

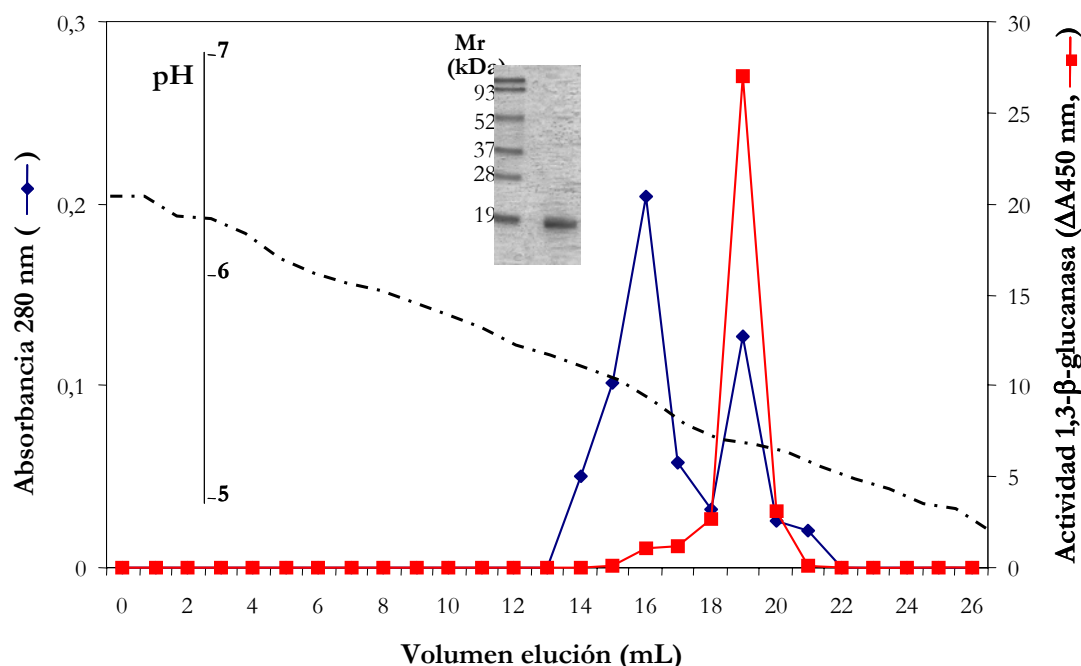


Figura 40. Perfil de elución mediante cromatoenfoco (pH 6-5) de la retención de proteínas (—◆—) y de la actividad 1,3-β-glucanasa (—■—) de las fracciones 15-18 eluidas en un gradiente de pH 6-4. El extracto proteico procedente del mesocarpio de chirimoyas pretratadas con altas concentraciones de CO₂ y conservadas 9 días a 6 °C fueron preparadas como se describe en el apartado de *Material y métodos* y aplicadas en una columna Mono-P HR 5/20. Las proteínas fueron eluidas con 26 mL de un gradiente de pH (.....). **Figura interior:** Patrón SDS-PAGE de la fracción 19. La actividad enzimática de cada fracción fue determinada de acuerdo a las condiciones estandar.

Tabla 11. Purificación de AGlu19 a partir de mesocarpio de chirimoyas pretratadas con altas concentraciones de CO₂ y conservadas 9 días a 6 °C

Fracción	Proteína total (mg)	Actividad total (U) ^y	Actividad específica (U · mg ⁻¹)	Recuperación (%) ^z	Factor de purificación ^a
Extracto crudo ^x	239,92	256,60	1,07	100,00	1,00
Ultrafiltración	39,18	112,88	2,88	44,01	2,69
Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ 20-85 %	31,93	72,75	2,28	28,36	2,13
Mono-Q HR 5/5 pH 8.0	3,61	16,84	4,67	6,56	4,37
Mono-P HR 5/20 pH 6-4	1,03	5,11	4,97	1,99	4,65
Mono-P HR 5/20 pH 6-5	0,18	3,45	18,98	1,35	17,76

^x El ensayo de actividad enzimática se realizó tras un paso de desalado con columnas 10DG (Bio-Rad).

^y Los datos de actividad corresponden a unidades de actividad (1 μmol equivalente glucosa · min⁻¹) frente a laminarina (*Laminaria digitata*) a pH 5 y 37 °C.

^z Expresada en porcentaje de unidades de actividad enzimática.

^a Calculado mediante los valores de actividad específica (U · mg⁻¹ de proteína).

5.- Identificación de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa mediante técnicas proteómicas

Los datos presentados en el apartado 3.2 de los *Resultados* mostraron como las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa inducidas diferencialmente reaccionaban de forma positiva con anticuerpos policlonales de proteínas PR-Q y PR-2 obtenidos de hojas de tabaco. Aunque estos análisis sugirieron que estas enzimas presentaban una relación serológica con este tipo de proteínas PR, no permitieron establecer con certeza a que familia y clase particular pertenecen cada una de las isoenzimas. Así, con objeto de identificar estas proteínas, se recuperaron las proteínas de interés de los geles de poliacrilamida para su digestión enzimática con tripsina, analizándose los péptidos generados mediante técnicas de espectrometría de masas.

El número y naturaleza de los péptidos generados como consecuencia de la utilización de tripsina, la cual corta de un modo específico los enlaces peptídicos por el lado carboxilo de los aminoácidos Lys y Arg, dio lugar a un espectro PMF que es característico de cada proteína y, por lo tanto, un reflejo de su propia secuencia (Gattiker *et al.* 2002). En el *Anexo II* se presenta una recopilación de las huellas peptídicas y listados de masas monoisotópicas obtenidos para cada una de las isoenzimas analizadas en los geles de poliacrilamida.

Sólo la isoenzima purificada AGlu19 fue identificada mediante la confrontación de los datos del espectro PMF con la base de datos elegida (NCBIInr) utilizando el programa MASCOT. En la Tabla 12 se muestran los resultados de los análisis de esta isoenzima, incluyendo los valores de una serie de parámetros necesarios que fundamentan una identificación fiable de las proteínas analizadas. Estos parámetros son el número de masas de péptidos obtenidos mediante MALDI-TOF y su correspondencia con las masas de péptidos resultantes de digestiones teóricas de proteínas en las bases de datos (péptidos identificados), la probabilidad asociada a cada búsqueda (*score*) y el porcentaje de secuencia de la proteína candidata que cubren las masas de los péptidos que hemos podido identificar (cobertura de secuencia). En este sentido, la banda correspondiente a la isoenzima AGlu19 fue identificada con el producto de la traducción de *PR-Q'*, un ARNm que codifica una endo-1,3- β -glucanasa básica de clase III de *Solanum lycopersicum* (CAA52872 ; Domingo *et al.*, 1994). El *score* fue de 82 y un total de nueve masas correspondieron a péptidos de la proteína identificada en la base de datos NCBIInr, representando todo ellos un total del 36 % de residuos totales de su estructura primaria.

Para el resto de isoenzimas, el listado de masas procedente del espectro PMF no fue suficiente para la obtención de una identificación positiva significativa. Así, se optó entonces por la obtención del espectro de fragmentación del máximo número posible de sus péptidos mediante el sistema CID (*Anexo II*). Asimismo, la utilización del programa MASCOT nos permitió correlacionar los datos de los espectros EM/EM de estos péptidos con los espectros teóricos de péptidos presentes en la base de datos NCBIInr con la misma masa molecular. Además, si se combina el listado *m/z* del espectro PMF de la proteína con los resultados de estos análisis EM/EM mediante la herramienta *Sequence Query*, se puede obtener tanto la identificación de la

proteína como la secuencia de los péptidos. En el caso de la isoenzima BChi14, aunque únicamente pudimos obtener el espectro de fragmentación de uno de sus péptidos (m/z : 1769,8680), la búsqueda en la base de datos nos permitió identificar la isoenzima BChi14 con el producto de la traducción de un gen que codifica una endoquitinasa básica de clase Ib de *Triticum aestivum* (CAA53626; Liao *et al.*, 1994). En la Tabla 12 podemos constatar que aunque el valor de parámetros de esta identificación fueron modestos (13 % de cobertura de secuencia y 4 péptidos), su significancia estadística se encontró dentro de unos buenos niveles (0.00031). Asimismo, el *score* (80) de la identificación de la secuencia del péptido fragmentado fue significativo estadísticamente. Por otro lado, al aplicar la herramienta de búsqueda de similitud BLASTp a dicha secuencia (GPIQISYNYNYGPAGR) frente a la base de datos NCBI nr, encontramos que ésta se correspondía casi completamente (93-100 % identidad) con una región del conservado dominio catalítico de las quitinasas GH19 (*Anexo II*).

Para la isoenzima BChi33 se obtuvo el espectro de fragmentación de siete de sus péptidos, los cuales correspondieron a los siguientes valores de m/z : 980,5059 (P1), 1274,7179 (P2), 1648,9154 (P3), 1761,0138 (P4), 2284,3582 (P5), 2530,3176 (P6) y 2755,3035 (P7) (*Anexo 2*). En este sentido, salvo los péptidos P2 y P3, el resto pudieron ser identificados con el programa MASCOT 1.9. Así, la identificación global utilizando toda la información obtenida mediante búsquedas en la base de datos NCBI nr nos indicó que BChi33 se correspondía de un modo significativo con el producto de la traducción del gen que codificaba una endoquitinasa básica de clase Ib de *Castanea sativa* que presentaba una masa molecular similar a la de BChi33 (AAB01895). Dentro de los parámetros de significancia estadística de esta identificación, se observó un valor muy superior a los obtenidos para las isoenzimas AGlu19 y BChi14. En concreto, el *score* alcanzó un valor de 350, presentando Asimismo un total de 9 péptidos identificados y una cobertura de secuencia del 34 % (Tabla 12). Por otro lado, el análisis de los resultados del experimento de fragmentación CID de los péptidos P1 y P7 mostraron como éstos presentaron una identificación de secuencia no significativa ($P \leq 0,05$) debido a su bajo *score* (38 y 5 respectivamente). En este sentido, hay que tener en cuenta que el valor umbral establecido por el algoritmo MASCOT para la fragmentación teórica de un péptido equivale a 45 (Tabla 13). No obstante, los espectros EM/EM de los péptidos P4, P5 y P6 fueron identificados de un modo significativo (*score* de 118, 61 y 85, respectivamente) y sus secuencias correspondieron a GPIQLTHNYNYGQAGK (P4), AIGADLINNPDLVATNPTISFK (P5) y VPSYGVITNIINGGLECGHGSDDR (P6). En este sentido, al utilizar la herramienta BLASTp con las tres secuencias confirmadas por MASCOT frente a la base de datos NCBI nr, se observó que éstas mostraron un 100 % de identidad con diferentes regiones del conservado dominio catalítico de las quitinasas GH19 de clase I (Figura 41). Con objeto de determinar la secuencia de los péptidos P2 y P3, se optó por aplicar la secuenciación *de novo*. Con esta metodología se intentó determinar las diferencias de masas secuenciales entre los iones del espectro EM/EM, pudiendo atribuirse éstas a las masas de aminoácidos individuales y deduciendo en suma la secuencia final (Dancik *et al.*, 1999) (*Anexo II*). En este sentido, la aplicación DeNovo Explorer nos proporcionó los dos resultados más probables para ambos péptidos, siendo sus secuencias

GERPSAADTSAGR (P2) y SPGFYTYNAFLAAAR (P3) respectivamente. Tras realizar una búsqueda con BLASTp de ambas secuencias frente a la base de datos NCBI nr pudimos constatar un resultado similar al observado para los péptidos P4, P5 y P6 (Fig. 41).

Por otro lado, la isoenzima AChi26 fue identificada utilizando la secuencia deducida del único péptido de su PMF que pudo ser fragmentado ($m/z = 1769,8765$; *Anexo II*). Mediante la herramienta *MS/MS Ion Search* del programa MASCOT 1.9, se pudo observar como este péptido era identificado con una región del fragmento de una endoquitinasa de la gramínea *Coix lacryma-jobi* (P15326; Ary *et al.*, 1989). Al igual que la isoenzima BChi14, aunque la cobertura de secuencia observada (12 %) fue baja, la significancia estadística asociada a esta búsqueda ($5,4 \cdot 10^{-5}$) fue suficiente para probar la certeza de la identificación (Tabla 12). Asimismo, una búsqueda de similitud mediante BLASTp de esta secuencia de 16 aminoácidos (GPIQISYNYNYGPAGR) frente a la base de datos NCBI nr proporcionó valores de identidad del 100 % con una zona central del conservado dominio catalítico de las quitinasas GH19.

En los trabajos realizados en esta tesis, se consiguió identificar 4 de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas del mesocarpo de chirimoyas mediante la búsqueda en las bases de datos de la información proporcionada por los espectros de las huella peptídicas y/o de los péptidos procedentes de la digestión con tripsina. Sin embargo, los espectros de los péptidos obtenidos de las isoenzimas AChi48 y AChi24 no dieron ningún resultado positivo en dicha búsqueda, a pesar de que estos fueron, aparentemente, de buena calidad. En estos casos, la estrategia utilizada ha sido la secuenciación *de novo* de los péptidos de interés, con objeto de determinar su secuencia completa y obtener información sobre el posible origen de la proteína mediante un análisis de su similitud con otras proteínas y marcadores de secuencias expresadas (EST, *expressed sequence tag*) de las bases de datos. A diferencia de la identificación mediante búsqueda en bases de datos (en la que se comparan los valores de los fragmentos obtenidos en el espectrómetro con los valores que se calculan al fragmentar virtualmente secuencias peptídicas extraídas de la base de datos con el mismo peso molecular que el ión precursor), en la secuenciación *de novo* los espectros se interpretan a partir del análisis de los patrones de fragmentación, sin recurrir a datos de secuencia externos.

Tabla 12. Identificación de las isoenzimas AChi26, BChi33, BChi14 y AGlu19 purificadas del mesocarpo de chirimoya mediante espectrometría de masas

	AChi26	BChi33	BChi14	AGlu19
Proteína^x	P15326	AAB01895	CAA53626	CAA52872
Identificación^y (<i>especie</i>)	Inhibidor α -amilasa/endoquitinasa (<i>Coix lacryma-jobi</i> L.) ^c	Endoquitinasa (<i>Castanea sativa</i> Mill.)	Endoquitinasa (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Endo-1,3- β -glucanasa (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)
Exp./Teor. pI^y	4,55/6,07	8,93/8,45	8,26/7,38	5,25/9,68
Exp./Teor. Mr (kDa)^z	26,5/14,6	33,0/34,8	14,5/34,5	19,2/38,0
Método identificación^a	EM/EM	PMF+EM/EM	PMF + EM/EM	PMF
Péptidos identificados	1	5/9 ^d	1/4	9
Cobertura secuencia (%)	12	34	13	36
Mascot score^b	67	350	94	82
E-score	5,4 ·10 ⁻⁵	4,6 ·10 ⁻²⁹	0,00031	0,04

^x Número de acceso de la proteína identificada en la base de datos NCBI utilizada para la búsqueda.

^y Identidad putativa de la proteína analizada en base a los espectros obtenidos y las especies de las cuales se ha identificado esta secuencia homóloga.

^z Punto isoelectrico y masa molecular de la proteína analizada y de la identificada.

^a PMF, identificación por huella peptídica; PMF+EM/EM, Identificación mediante la combinación de la huella peptídica y los espectros de fragmentación de los péptidos.

^b Probabilidad asociada a el calculo de similitud con el algoritmo MASCOT en la base de datos NCBI^{nr}, siendo $P \leq 0,05$.

^c La secuencia de la proteína identificada corresponde a un fragmento de la misma.

^d x/y, x péptidos secuenciados mediante EM/EM; y péptidos identificados mediante PMF+EM/EM.

Tabla 13. Identificación de los péptidos de la isoenzima BChi33 purificada del mesocarpo de chirimoya mediante MALDI-TOF/TOF y búsqueda en las base de datos

Ion precursor (m/z) [M+ H] ⁺ _{mono.} ([M+H] ⁺ _{calc.})	Secuencia péptido ^x	Mascot score ^y	Proteína ^z	Identificación (especie) ^a
980,5082 (980,4586)	SWPCVFGK	38		
1761,0138 (1761,8642)	GPIQLTHNYNYGQAGK	118		
2284,3577 (2284,2110)	AIGADLINNPDLVATNPTISF K	61	AAB01895	Endoquitinasa (<i>Castanea sativa</i>)
2531,3105 (2530,1918)	VPSYGVITNIINGGLECGHG SDDR	85		
2755,3035 (2754,2166)	RYCDTLGVSYGNNLDCYNQ KPFA	5		

^x Secuencias de los péptidos identificadas con el algoritmo MASCOT en la base de datos NCBIInr.

^y Probabilidad asociada al calculo de similitud con el algoritmo MASCOT en la base de datos NCBIInr, siendo $P \leq 0,05$.

^z Número de acceso GI de la proteína identificada en la base de datos NCBI utilizada para la búsqueda.

^a Identidad putativa del péptidos de la proteína analizada en base a los espectros EM/EM obtenidos y las especies de las cuales se ha identificado esta secuencia homóloga.

En el caso de la isoenzima AChi48, tres péptidos fueron caracterizados mediante el análisis de la secuencia *de novo* ($m/z = 1435,7369$; $1769,8765$; $2028,9387$, Tabla 9), obteniéndose las secuencias LGEDAYEGELVLK, KPIGISYNYNYGAPGR y RGGAFFAQISHETGFGGAR respectivamente. Las secuencias de estos tres péptidos fueron utilizadas para identificar la isoenzima AChi48 a través de las búsquedas de similitud con el algoritmo FASTS. El resultado fue la asociación significativa ($3,3 \cdot 10^{-8}$) con el producto parcial de la traducción de un ARNm que codifica una quitinasa de clase I de *Capsicum annuum* (AAR90844). Asimismo, en el listado de proteínas identificadas mediante FASTS, pudimos constatar como en las primeras posiciones se situaban varias quitinasas de clase I y II de plantas. No obstante, en todas estas identificaciones únicamente dos de los tres péptidos ($m/z = 1769,8765$, $2028,9387$) mostraron similitud con la secuencia de las proteínas. En la Figura 42 se puede observar el resultado del alineamiento de la secuencia deducida de este péptido de AChi48 con la secuencias completa de otras quitinasas de clase I de plantas. Para este análisis se seleccionaron aquellas secuencias que presentaron un menor *E-value* tras aplicar la herramienta de búsqueda de similitud BLASTp a la secuencia predicha de la quitinasa de *C. annuum* (Fig. 42). De acuerdo a este análisis, se pudo concretar que dos de los péptidos generados a partir de la digestión de AChi48 presentaban un rango de identidad entre un 55 y un 60 % (RGGAFFAQISHETGFGGAR) y entre un 87 y un 93 % (KPIGISYNYNYGAPGR) con dos regiones del conservado dominio catalítico de varias quitinasas GH19 de clase I y II (Fig. 42). Esto último no resulta sorprendente, ya que como se ha establecido en la *Introducción* de este

trabajo, las enzimas quitinasa de clase I y II muestran un dominio catalítico muy similar, distinguiéndose principalmente por la presencia o ausencia del dominio CBD respectivamente.

Tabla 14. Identificación de las isoenzimas AChi48 y AChi24 purificadas del mesocarpo de chirimoya mediante la secuenciación *de novo* de aminoácidos

Isoenzima	AChi48	AChi24
Proteína^x	AAR90844	ABY66957
Identificación^y (<i>especie</i>)	Quitinasa de clase I (<i>Capsicum annuum</i> L.)	Quitinasa de clase IV (<i>Vitis pseudoreticulata</i> L.)
Exp./Teor. pI^z	4,43/n.d ^d	4,37/5,01
Exp./Teor. Mr (kDa)^z	48,5/n.d	24,1/27,3
Ion precursor (<i>m/z</i>)	1435,74	1890,01
[M+ H]⁺_{mono.}	1769,88	2023,01
	2028,93	2028,31
	LGEDAYEGELVLK	IPADIVTKAFFDGIINR
Péptidos^a	KPIGISYNYNYGAPGR	KGGAAFFAKLTHETGFGGAR
	RGGAFFAQISHETGFGGAR	GAIDGANKCDGKKPTLVNAR
Aa^b	51	59
E-score^c	3,3 · 10 ⁻⁸	2,3 · 10 ⁻¹⁰

^x Número de acceso de la proteína identificada en la base de datos NCBI utilizada para la búsqueda.

^y Identidad putativa de la proteína analizada en base a los espectros obtenidos y las especies de las cuales se ha identificado esta secuencia homóloga.

^z Punto isoelectrico y masa molecular de la proteína analizada y de la identificada.

^a Secuencias *de novo* de los péptidos usadas en el cálculo de similitud.

^b Número total de aminoácidos usados en el cálculo de similitud.

^c En FASTS, el valor E(N) significa el número de veces que el resultado puede obtenerse al azar frente a una base de datos de tamaño N. Se utilizó la base de datos NCBIInr, N= 10395550.

^d Se desconoce tanto la masa molecular como el punto isoelectrico de la proteína identificada.

Por último, en el caso de la isoenzima AChi24, la aplicación informática DeNovo Explorer utilizó los patrones de fragmentación de los péptidos con una *m/z* de 1890,0188, 2023,0128 y 2028,3145 procedentes de la ruptura con tripsina (Tabla 14). El calculo de similitud de las secuencias deducidas de los iones precursores (IPADIVTKAFFDGIINR, KGGAAFFAKLTHETGFGGAR y GAIDGANKCDGKKPLVNAR, respectivamente) en la base de datos NCBIInr mediante FASTS condujeron a una identificación con una probabilidad asociada significativa (2,3 · 10⁻¹⁰) con el producto de la traducción del ADNc que codificaba una quitinasa ácida de clase IV de *Vitis pseudoreticulata* (ABY66957). De un modo semejante a la isoenzima AChi48, se realizaron estudios de alineamiento de las secuencias de los

correspondientes péptidos. En este sentido, los tres péptidos se situaron en regiones separadas del conservado dominio catalítico de varias quitinasas de clase IV (Fig. 43). Por otro lado, la búsqueda de similitud con estas secuencias mediante BLASTp frente a la base de datos NCBI nr arrojó valores de identidad que variaban entre un 65 y un 94 % para el conservado dominio catalítico de varias quitinasas de esta clase.

A lo largo de este trabajo de investigación se ha utilizado de un modo recurrente el término isoenzima, y no isoforma, para referirnos a las diferentes enzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa. En el compendio de terminología química de la IUPAC (McNaught y Wilkinson, 1992), el término isoenzima se aplica a aquel grupo de enzimas relacionadas que catalizan la misma reacción pero tienen diferentes estructuras moleculares, estando caracterizadas por distintas propiedades físicas, bioquímicas e inmunológicas. Asimismo, y de acuerdo a esta misma nomenclatura, se recomienda el uso restringido del término isoenzima a productos de multiplicidad debidos a causas genéticas. Esto, por tanto, excluye todas las múltiples formas originadas por modificaciones post-traduccionales. De un modo semejante, Griffiths y Black (1987), proponen el término isoforma para todas aquellas formas de una misma enzima cuyo origen no está totalmente establecido o es claramente postraduccional. En nuestro caso concreto, utilizamos la identificación por espectrometría de masas para establecer su naturaleza y origen. Los resultados obtenidos mostraron que las formas de estas dos enzimas hidrolíticas presentaban suficientes diferencias en sus estructuras primarias como para establecer que su origen se sitúa en la diversidad genética. Así, en las búsquedas en la base de datos NCBI nr no se encontraron coincidencias entre los listados de las identificaciones de las diferentes enzimas purificadas. Esto nos lleva a concluir que ninguna de ellas tiene una procedencia derivada de la modificación de alguna secuencia primaria analizada en este trabajo. Por otro lado, y aunque nosotros usemos el término isoenzima, al citar otros trabajos donde se utilice el concepto isoforma se respetará el criterio utilizado por sus autores.

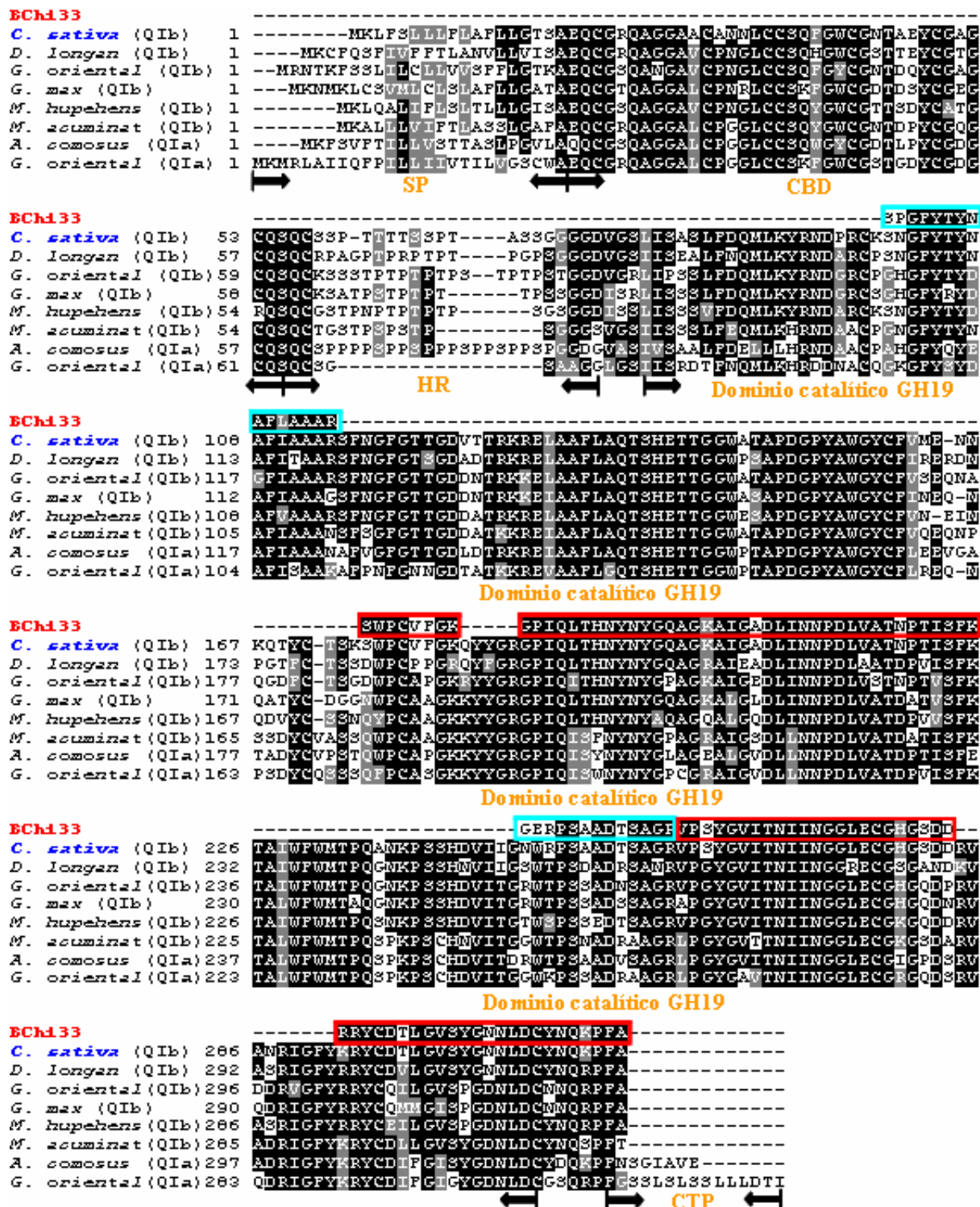


Figura 41. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los siete péptidos generados a partir de BCh133 con la secuencias de quitinasas de plantas de clase Ib y Ia, incluyendo la quitinasa de *C. sativa* identificada por MASCOT. Números de acceso clase Ib: *Castanea sativa*, AAB01895; *Dimocarpus longan*, ACH92946; *Galega orientalis*, AAP03087; *Glycine max*, AAF17593; *Malus hupehensis*, ACJ38195. Números de acceso clase Ia: *Musa acuminata*, ACJ06634; *Ananas comosus*, AB290909; *Galega orientalis*, AY253987. Las áreas oscurecidas/grises indican aminoácidos idénticos/ con similitud parcial en al menos dos de las secuencias. Los espacios (-) han sido introducidos para un máximo alineamiento de secuencias. Las secuencias de los péptidos de BCh133 obtenidas por MASCOT y de novo se muestran enmarcadas en rojo y azul respectivamente. SP (Peptide signal, péptido señal); CBD (Chitin binding domain, dominio de unión a quitina); HR (Hinge region, región conectora), CTP (Carboxi terminal propeptide, propéptido carboxi terminal).

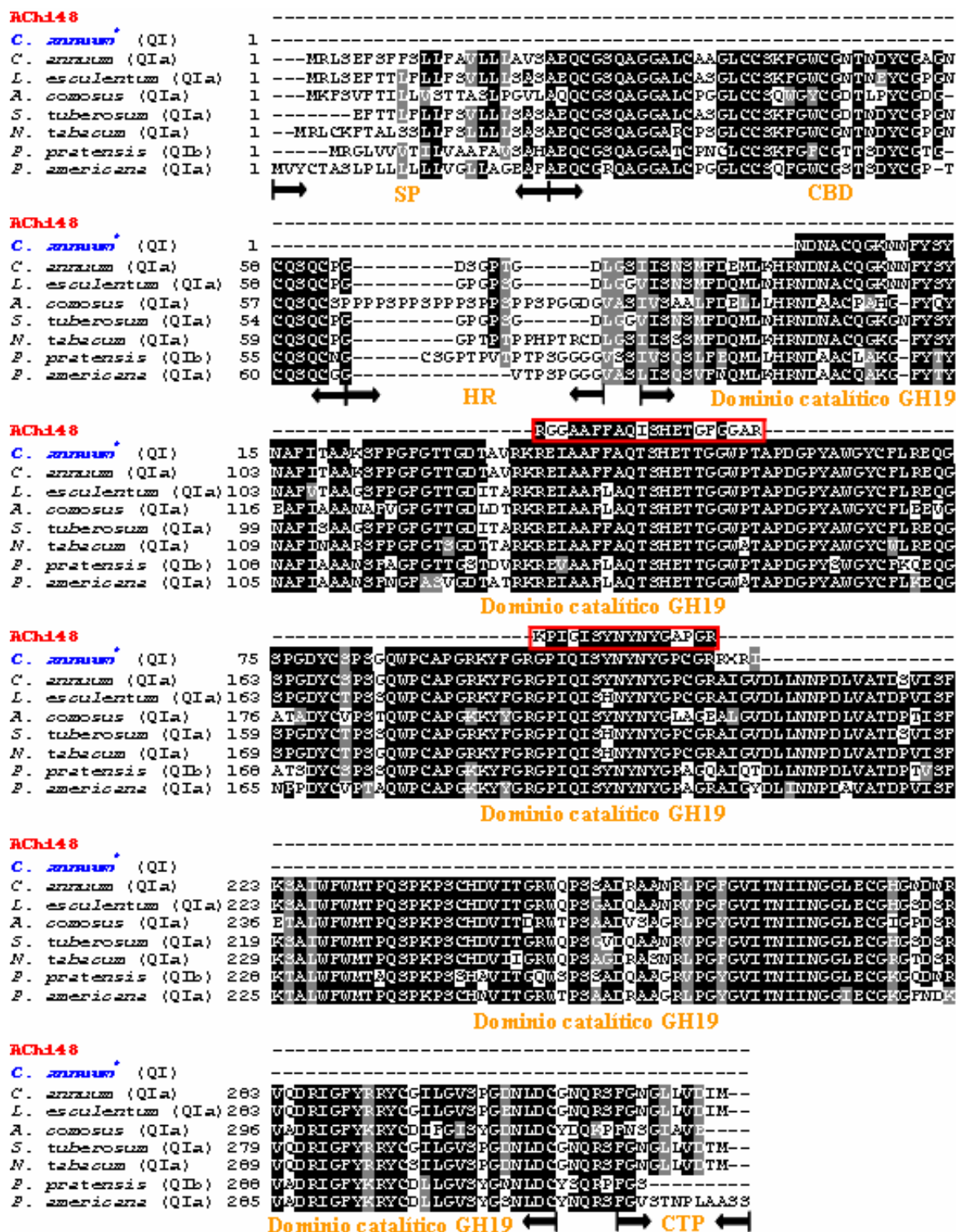


Figura 42. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de uno de los péptidos generados a partir de AChi48 con la secuencias de quitinasas de plantas de clase Ia y Ib, incluyendo la secuencia parcial de la quitinasa de clase I de *C. annuum* identificada por FASTS. Números de acceso clase Ia: *Capsicum annuum*, AY498564; *Capsicum annuum*, FJ596176; *Lycopersicon esculentum*, Q05538; *Ananas comosus*, AB290909; *Solanum tuberosum*, P52403; *Nicotiana tabacum*, AAB23374; *Persea americana*, Z78202. Números de acceso clase Ib: *Poa pratensis*, AF000966. Las áreas oscuras/grises indican aminoácidos idénticos/ con similitud parcial en al menos dos de las secuencias. Los espacios (-) han sido introducidos para un máximo alineamiento de secuencias. La secuencia del péptido fragmentado de AChi48 se muestra enmarcada en rojo. SP (Peptide signal, péptido señal); CBD (Chitin binding domain, dominio de unión a quitina); HR (Hinge region, región conectora), CTP (Carboxi terminal propeptide, propéptido carboxi terminal).

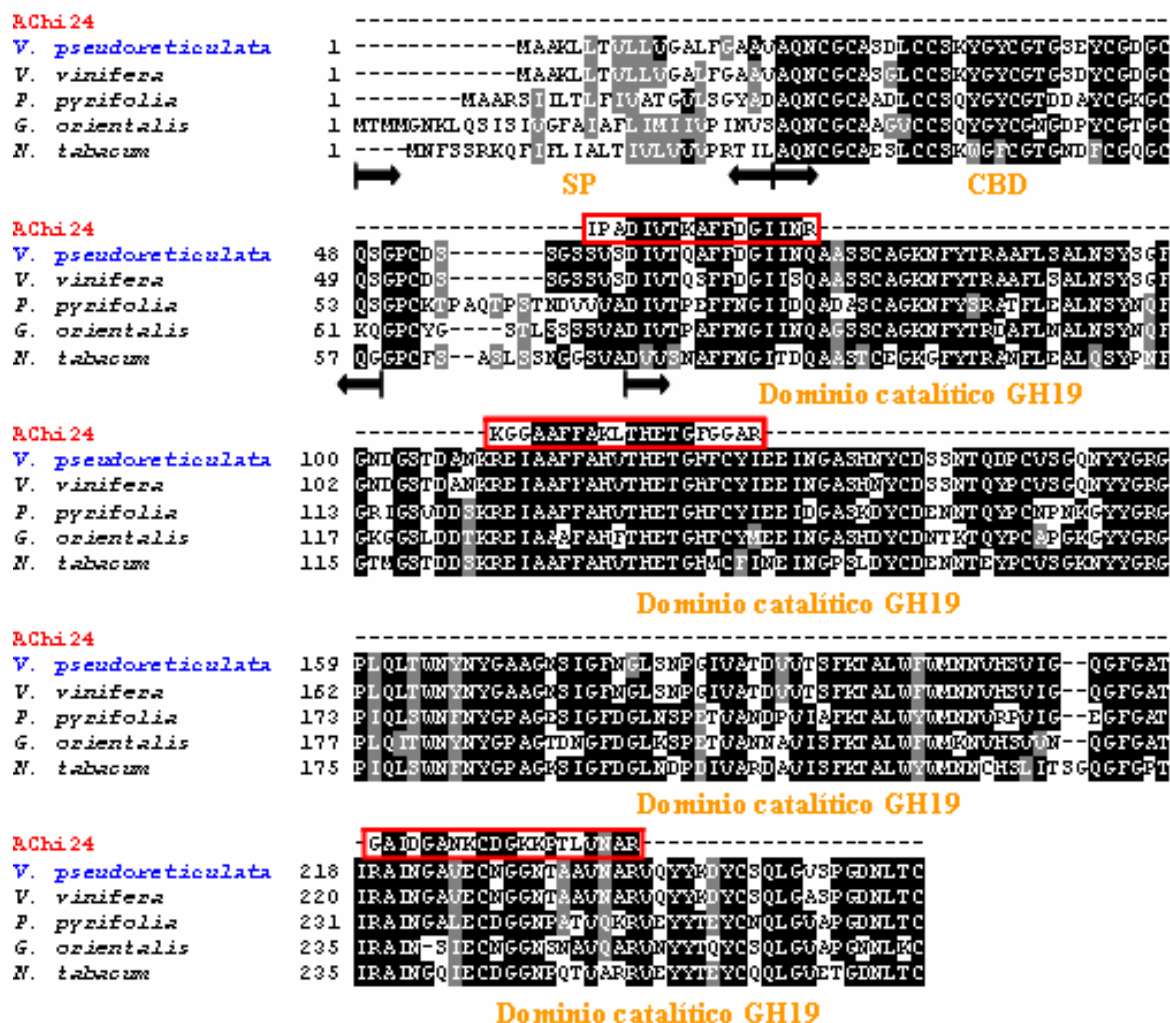


Figura 43. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de tres de los péptidos generados a partir de AChi24 con la secuencias de quitinasas de plantas de clase IV, incluyendo la quitinasa de *V. pseudoreticulata* identificada por FASTS. Números de acceso: *Vitis pseudoreticulata*, ABY66957; *Vitis vinifera*, AAB65776; *Pyrus pyrifolia*, ACM45716; *Galega orientalis*, AY253984; *Nicotiana tabacum*, BAF44533. Las áreas oscurecidas/grises indican aminoácidos idénticos/ con similitud parcial en al menos dos de las secuencias. Los espacios (-) han sido introducidos para un máximo alineamiento de secuencias. Las secuencias de los péptidos fragmentados de AChi24 se muestran enmarcadas en rojo. SP (*Peptide signal*, péptido señal); CBD (*Chitin binding domain*, dominio de unión a quitina).

6.- Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa

6.1.- pH óptimo y estabilidad al pH

Se determinó la influencia del pH del medio de reacción en la velocidad de hidrólisis de los sustratos (CM-Chitin-RBV y laminarina) de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas a homogeneidad, así como la estabilidad de estas enzimas ante diferentes condiciones de pH. Con el objeto de facilitar el análisis y organización de los datos, se procedió a describir estos dos parámetros en tres grupos de enzimas. Por un lado, las tres isoenzimas quitinasa ácidas (AChi48, AChi26 y AChi24), por otro, las dos isoenzimas quitinasa básicas (BChi33 y BChi14), y por último, la isoenzima ácida 1,3- β -glucanasa (AGlu19). Además de indicar el valor óptimo de cada parámetro en el mantenimiento del 100 % de la actividad para cada una de las enzimas, se ha escogido arbitrariamente un valor de actividad relativa del 40 % a fin de establecer un rango de valores para cada uno de los parámetros estudiados, permitiéndonos un análisis comparativo de su efecto en la reacción de hidrólisis.

Como puede observarse en la Figura 44A, la isoenzimas AChi48, AChi26 y AChi24 presentan valores del pH óptimo muy cercanos entre sí, con máximos respectivos a 5,5, 6,0 y 5,0 unidades. Sin embargo, si atendemos al rango de pH en el que cada isoenzima mantiene un 40 % de la actividad relativa, sí se observaron mayores diferencias. Se encontró que, mientras AChi48 y AChi26 presentaron intervalos similares, pH de 3-6,5 y de 3-7,5 unidades respectivamente, AChi24 mostró un rango situado a valores de pH más alcalinos, de 4-10 unidades. En la Figura 44B se muestra el comportamiento de las tres isoenzimas ácidas después de ser incubadas a 37 °C durante 2 horas a diferentes valores de pH. Las tres isoenzimas ácidas mantienen un 100 % de su actividad en un rango de pH entre 3 y 7 unidades. Sin embargo, mientras que la isoenzima AChi48 es inactivada rápidamente fuera de este intervalo, las isoenzimas ácidas de baja masa molecular, AChi26 y AChi24, alcanzan un valor de actividad relativa superior al 40 % en un rango de pH de 2 a 11 unidades. Cabe destacar los altos niveles de estabilidad de AChi26 a pH fuertemente ácidos (alrededor del 70 % actividad relativa).

Atendiendo a la actividad quitinolítica de las isoenzimas básicas BChi33 y BChi14, mientras que el pH óptimo de reacción de la isoenzima BChi33 fue de 5,5 unidades, el máximo para BChi14 se situó en pH 7,0 (Fig. 45A). A diferencia de la isoenzima BChi33, que presentó un rango de pH de reacción que osciló entre 3 y 8 unidades, el intervalo encontrado para la isoenzima BChi14 se ubicó en pH más básicos (pH 4-10). En líneas generales, la estabilidad de ambas isoenzimas a diferentes pH fue semejante, oscilando en un amplio rango de pH de 2-12 unidades. Sin embargo, hay que destacar la mayor estabilidad de BChi14 en condiciones fuertemente ácidas (pH 2), con valores de actividad relativa superiores en un 30 % a los detectados para BChi33 (Fig. 45B).

La isoenzima purificada AGlu19 mostró una actividad hidrolítica máxima frente a laminarina a pH 5,0, manteniendo el 40 % de la actividad máxima en un rango de 3 a 6,5

unidades de pH (Fig. 46A). La estabilidad de esta enzima decreció de forma considerable a valores de pH básicos, manteniéndose estable en el rango de valores de pH ácido ensayados (Fig. 46B).

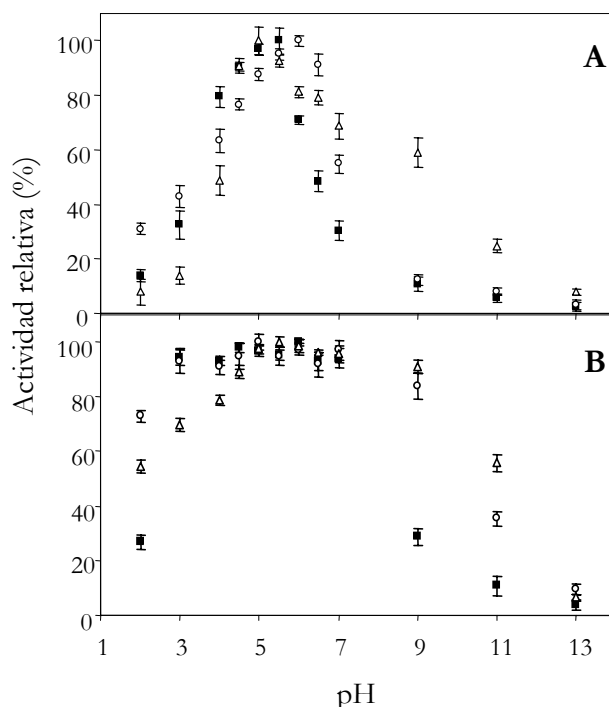


Figura 44. Efecto del pH sobre la actividad enzimática y estabilidad de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpo de chirimoya AChi48 (■), AChi26 (○) y AChi24 (△). (A) El efecto del pH sobre las actividades enzimáticas fue examinado tras una incubación a 37 °C durante 10 min. (B) El efecto del pH sobre las estabildades fue examinado tras una incubación a 37 °C durante 2 horas.

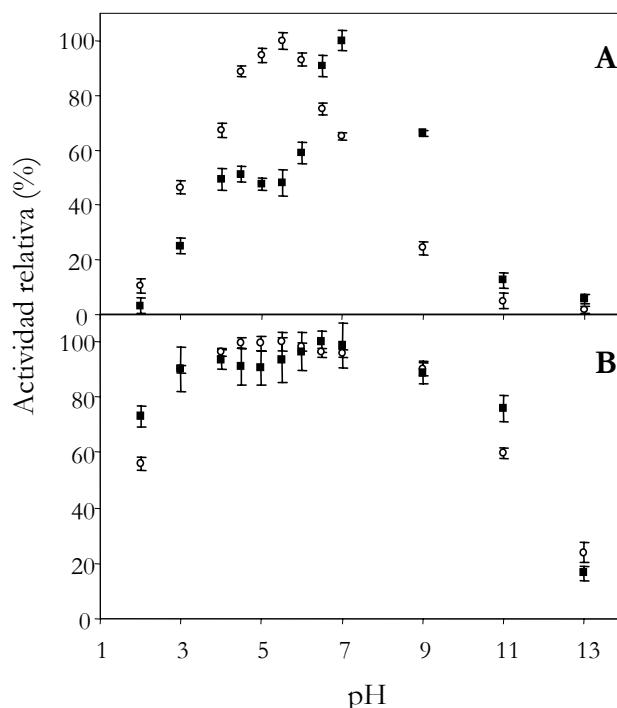


Figura 45. Efecto del pH sobre la actividad enzimática y estabilidad de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpo de chirimoya BChi33 (○) y BChi14 (■). (A) El efecto del pH sobre las actividades enzimáticas fue examinado tras una incubación a 37 °C durante 10 min. (B) El efecto del pH sobre las estabildades fue examinado tras una incubación a 37 °C durante 2 horas.

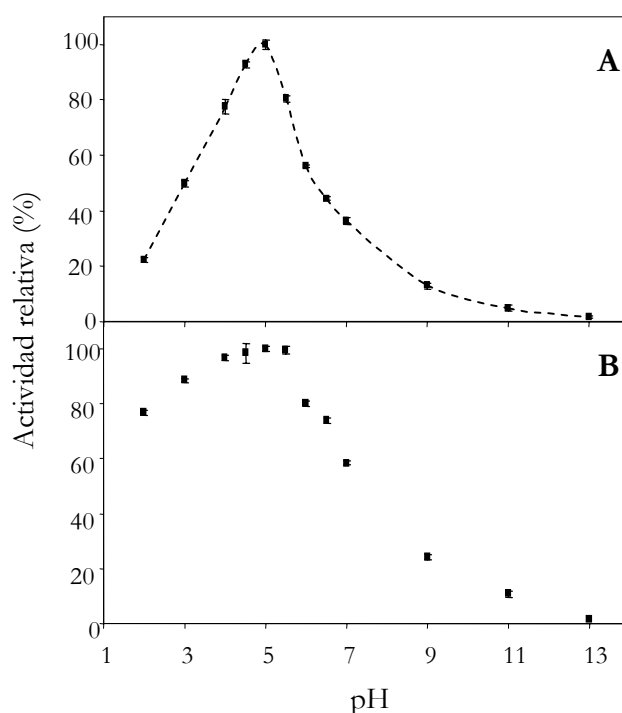


Figura 46. Efecto del pH sobre la actividad enzimática y estabilidad de la isoenzima AGlu19 purificada de mesocarpio de chirimoya (■). (A) El efecto del pH sobre las actividades enzimáticas fue examinado tras una incubación a 37 °C durante 10 min. (B) El efecto del pH sobre las estabilidades fue examinado tras una incubación a 37 °C durante 2 horas.

6.2.- Temperatura óptima y termoestabilidad

Siguiendo lo expuesto en la sección de *Material y métodos* se determinaron la temperatura óptima de reacción y la termoestabilidad de las enzimas purificadas, analizando los resultados mediante los criterios mencionados en el apartado anterior.

La hidrólisis enzimática de CM-Chitin-RBV por parte de las isoenzimas quitinasa AChi48 y AChi26 presentó una temperatura óptima de 35 y 37 °C respectivamente, mientras que el óptimo para la isoenzima AChi24 fue de 45 °C. Por otro lado, mientras AChi26 y AChi24 no presentaron prácticamente actividad enzimática a bajas temperaturas, actuando en un intervalo de temperaturas medias-altas (20-75 °C y 15-70 °C, respectivamente), el rango de temperatura de la isoenzima AChi48 estuvo más desplazado a las bajas temperaturas, reteniendo cerca de un 50 % de la actividad máxima a 5 °C y presentando actividad hidrolítica hasta 60 °C (Fig. 47A). Con respecto a la termoestabilidad, el perfil observado en la figura 47B permitió establecer que la isoenzima AChi26 era significativamente más estable a altas temperaturas que AChi48 y AChi24. La isoenzima AChi26 resultó estable hasta 80 °C, manteniendo cerca de un 50 % de la actividad máxima. Sin embargo, la termoestabilidad de AChi48 y AChi24 se limitó a 65 y 75 °C respectivamente (Fig. 47B).

La temperatura óptima de reacción de las dos isoenzimas básicas BChi33 y BChi14 fue de 37 y 35 °C respectivamente. Aunque el rango de temperaturas en el que se situó la reacción de hidrólisis de ambas isoenzimas osciló entre 20 y 60 °C, BChi14 presentó una moderada actividad

a bajas temperaturas, reteniendo cerca del 30 % de la actividad máxima a 5 °C (Fig. 48A). Cabe destacar, que mientras que la isoenzima BChi14 fue inactivada rápidamente con temperaturas superiores a los 55 °C, la isoenzima BChi33 se mantuvo estable hasta los 75 °C, reteniendo cerca de un 80 % de la actividad máxima a 55 °C (Fig. 48B).

Como se observa en la figura 49A, la temperatura óptima de reacción para la isoenzima AGlu19 es de 40 °C, presentando una hidrólisis efectiva de laminarina en un rango de bajas temperaturas (5-55 °C) y conservando cerca de un 40 % de actividad a la temperatura más baja ensayada. Asimismo, la termoestabilidad de esta isoenzima oscila entre 5 y 65 °C, observándose niveles casi indetectables de actividad después de la incubación durante 2 horas a temperaturas iguales o superiores a 70 °C (Fig. 49B). Cabe también destacar que la enzima fue inactivada rápidamente a temperaturas superiores a 60 °C.

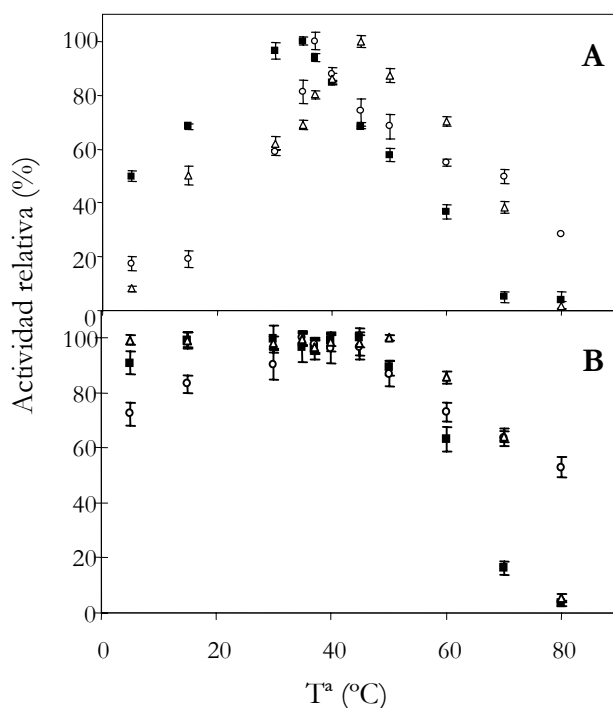


Figura 47. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática y estabilidad de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya AChi48 (■), AChi26 (○) y AChi24 (Δ). (A) El efecto de la temperatura sobre las actividades enzimáticas fue examinado tras una incubación durante 10 min al pH óptimo de cada enzima. (B) El efecto de la temperatura sobre las estabilidades fue examinado tras una incubación en tampón acetato de sodio/ácido acético 0,1 M, pH 5,0, durante 2 horas.

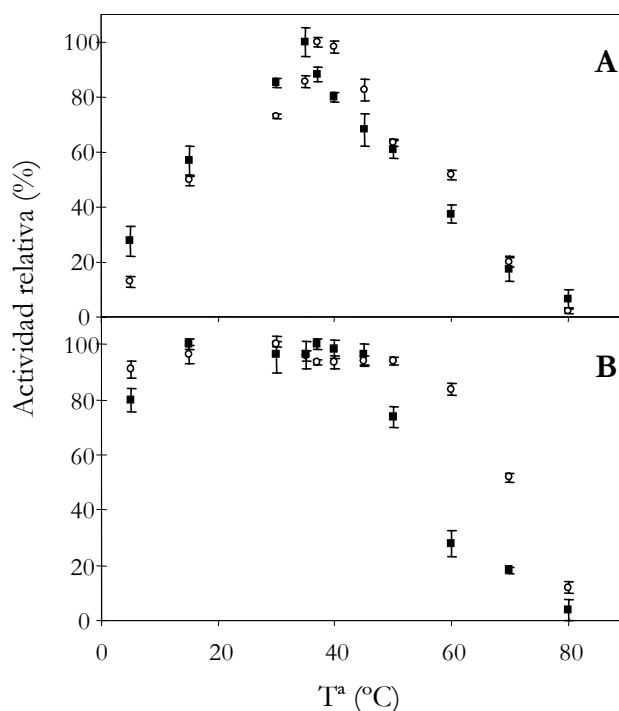


Figura 48. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática y estabilidad de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya BChi33 (○) y BChi14 (■). (A) El efecto de la temperatura sobre las actividades enzimáticas fue examinado tras una incubación durante 10 min al pH óptimo de cada enzima. (B) El efecto de la temperatura sobre las estabilidades fue examinado tras una incubación en tampón acetato de sodio/ácido acético 0,1 M, pH 5,0, durante 2 horas.

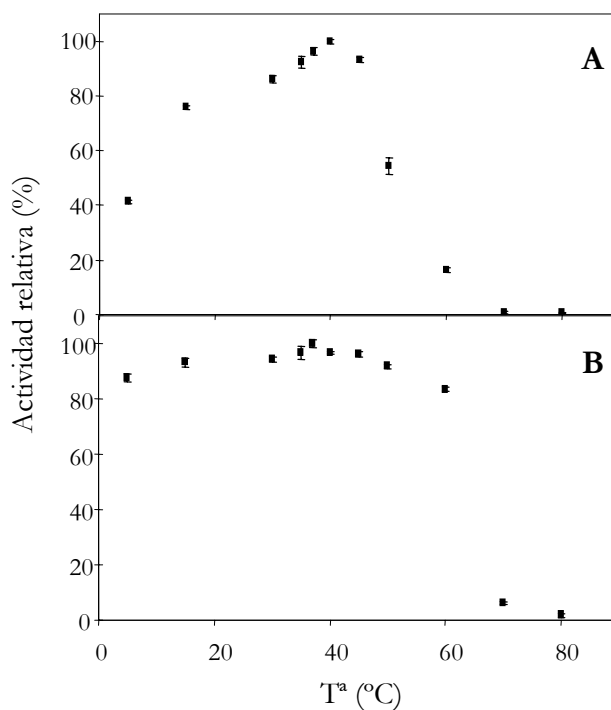


Figura 49. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática y estabilidad de la isoenzima AGlu19 purificada de mesocarpio de chirimoya (■). (A) El efecto de la temperatura sobre las actividades enzimáticas fue examinado tras una incubación durante 10 min a pH 5,0. (B) El efecto de la temperatura sobre las estabilidades fue examinado tras una incubación en tampón acetato de sodio/ácido acético 0,1 M, pH 5,0, durante 2 horas.

7.- Propiedades fisicoquímicas de las isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa

7.1.- Determinación de la masa molecular

Las masas moleculares de las isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa purificadas a homogeneidad fueron determinadas mediante electroforesis desnaturalizante en medio no reductor (Fig. 50 y Tabla 15). En el caso de las isoenzimas AChi48, AChi26 y AChi24, las masas moleculares fueron de $48,5 \pm 0,2$, $25,8 \pm 0,2$ y $24,1 \pm 0,6$ kDa respectivamente. Como se muestra en la Figura 38, un análisis SDS-PAGE en condiciones reductoras de éstas dio lugar a tres bandas únicas para las isoenzimas quitinasa ácidas. Al estimar sus masa molecular, se observó que las bandas correspondiente a las isoenzimas AChi48 y AChi26 tenían un valor similar al cuantificado en el ensayo en condiciones no reductoras ($48,4 \pm 0,4$ y $26,8 \pm 0,5$ kDa, respectivamente). Sin embargo, la banda de la isoenzima AChi24 presentó un valor de masa molecular superior al observado con anterioridad ($27,9 \pm 0,3$ kDa).

En el caso de las isoenzimas quitinasas BChi33 y BChi14, el análisis SDS-PAGE en condiciones no reductoras seguido de la tinción con azul de Coomassie detectó la presencia de bandas con masas moleculares estimadas de $33,0 \pm 0,2$ y $14,5 \pm 0,2$ kDa respectivamente (Fig. 50 y Tabla 15). El establecimiento de un medio reductor en esta electroforesis permitió observar la presencia de dos únicas bandas para estas isoenzimas básicas, siendo la correspondiente a BChi14 de una masa molecular ligeramente inferior a la descrita en condiciones no reductoras ($14,2 \pm 0,3$ kDa). Como en el caso de AChi24, la isoenzima BChi33 presentó una banda de masa molecular superior en condiciones reductoras, estimando su valor en $36,5 \pm 0,7$ kDa (Fig. 50).

La electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras de la isoenzima 1,3-β-glucanasa dio lugar a una única banda correspondiente a un polipéptido con una masa molecular de $19,2 \pm 0,6$ kDa (Fig. 50 y Tabla 15). La adición de β-mercaptoetanol al tampón de carga de la electroforesis no varió el perfil observado en condiciones no reductoras, detectándose una banda con una masa molecular de $19,1 \pm 0,4$ kDa (Fig. 50).

Por tanto, de acuerdo a la ausencia de múltiples bandas de baja masa molecular en condiciones reductoras, se puede concluir que todas las isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa purificadas en este trabajo presentan una naturaleza monomérica. Asimismo, el grado de pureza y el estado de oligomerización de las isoenzimas purificadas fueron confirmadas mediante el análisis MALDI-TOF de su masa molecular. En este sentido, los espectros de masas mostraron los correspondientes picos de las proteínas en función de su carga (*Anexo I*). De acuerdo al valor del pico con una única carga $[M + H]^+$, la masa molecular de AChi48, AChi26 y AChi24 fue de $47774,3 \pm 6$, $25958,5 \pm 3$ y $24788,1 \pm 4$ Da respectivamente. Con respecto a las isoenzimas básicas, BChi33 y BChi14 mostraron sendos valores de $33269,6 \pm 8$ y $14309,0 \pm 5$ Da. Por último el espectro de masas de la isoenzima AGlu19 reveló una masa molecular de $22074,48 \pm 4$ Da, un valor ligeramente superior al estimado mediante SDS-PAGE.

Asimismo, y tal como se indica en el apartado 3.2 de *Resultados*, se calculó las masas moleculares en condiciones no reductoras de las isoenzimas quitinasas y 1,3- β -glucanasas constitutivas y aquellas inducidas diferencialmente durante el proceso de maduración a 20°C (Tabla 15). En este punto, resulta conveniente aclarar la naturaleza de AChi40, la cual se consideró una única proteína tras la obtención del perfil de isoenzimas (Fig. 21). Tras analizar mediante electroforesis SDS-PAGE e inmunoensayo los picos de mayor actividad quitinolítica del primer paso de cromatoenfoco de la purificación de la isoenzima AChi26 (Fig. 33), se observó que en el intervalo de fracciones del segundo pico (19-23) la isoenzima AChi40 estaba compuesta en realidad por dos isoenzimas superpuestas (Fig. 51). Una de ellas, denominada AChi40a, eluyó entre las fracciones 20 y 21 y mostró una masa molecular de $42,5 \pm 0,8$ kDa. La otra isoenzima (AChi40b) eluyó en la siguiente fracción (22) y su estima de la masa molecular dio un valor de $39,5 \pm 0,3$ kDa.

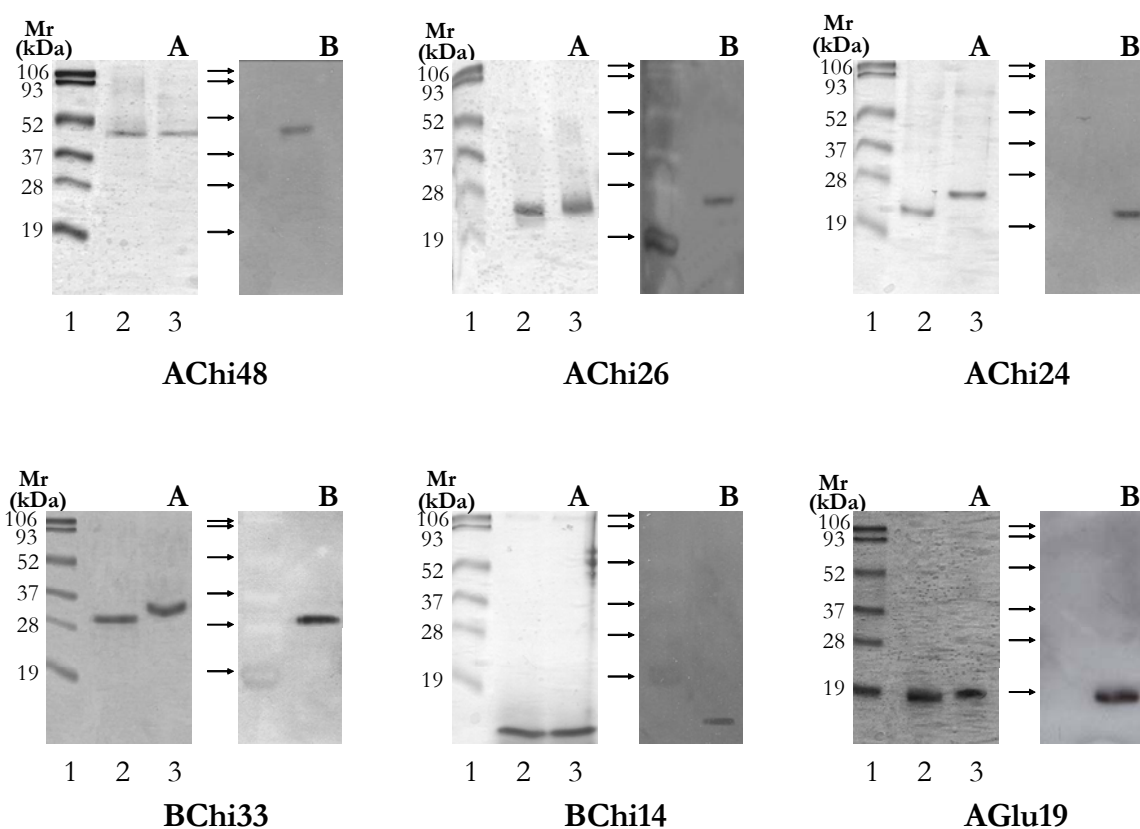


Figura 50. Análisis electroforético de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas de mesocarpio de chirimoya. (A) SDS-PAGE de la isoenzima purificada. 1) Patrón de masa molecular, 2) Sin 2-ME, 3) Con 2-ME. Las proteínas purificadas (2 μ g) fueron separados mediante en un gel con un 13,5 % poliacrilamida y teñidas con Azul de Coomassie Brilliant Blue R-250. (B) Inmunoensayo de la isoenzima purificada (2 μ g) y detección con anticuerpos de tabaco frente a proteínas PR-Q (quitinasa) y PR-2 (1,3- β -glucanasa).

7.2.- Determinación del punto isoelectrico

Los resultados de los puntos isoelectricos de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas determinados por cromatofoco se muestran en la Tabla 15. Mientras que el punto isoelectrico de las isoenzimas ácidas AChi48, AChi27 y AChi24 presentaron valores muy cercanos entre si ($4,43 \pm 0,07$, $4,05 \pm 0,04$ y $4,37 \pm 0,06$ unidades respectivamente), la isoenzima ácida AGlu19 tuvo un punto isoelectrico menos ácido ($5,25 \pm 0,07$ unidades). Los puntos isoelectrico para las isoenzimas básicas quitinasa BChi33 y BChi14 fueron moderadamente básicos, con valores de $8,93 \pm 0,02$ y $8,26 \pm 0,06$ respectivamente (Tabla 15).

La determinación del punto isoelectrico de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa constitutivas fue elucidado a lo largo de las diferentes purificaciones de este trabajo, atendiendo a los perfiles observados en los ensayos Western de las diferentes fracciones obtenidas. En líneas generales se puede establecer el fuerte carácter ácido de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa constitutivas ácidas, oscilando su punto isoelectrico en un estrecho rango (4,11 – 4,81 unidades). En el caso de AChi40, únicamente en uno de los pasos de purificación de AChi26 se pudo discriminar el doblete, exhibiendo unos valores del pI muy próximos entre sí (4,85 y 4,79 unidades). En los análisis realizados a fracciones de otras purificaciones, únicamente se encontró una única banda en la zona de 40 kDa con un pI promedio a estos dos valores (4,81 unidades). Este comportamiento no es tal en el caso de las isoenzimas constitutivas básicas. Mientras que las isoenzimas 1,3- β -glucanasa básicas exhibieron unos puntos isoelectricos moderadamente básicos, dentro de un intervalo que fluctuaba entre 7,5 y 8 unidades, las isoenzimas quitinasa mostraron un carácter alcalino más acentuado, con puntos isoelectricos que se situaron por encima de 8 unidades de pH (Tabla 15).

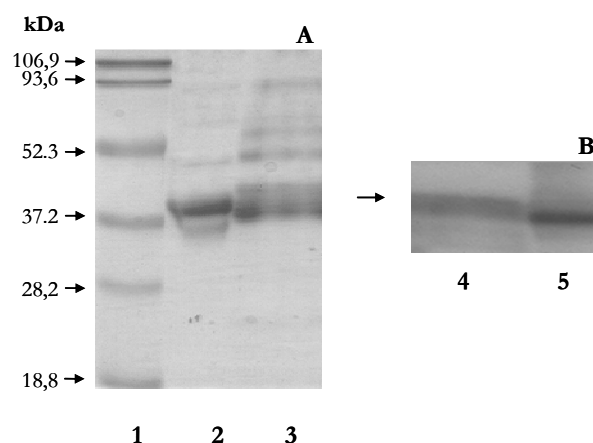


Figura 51. Caracterización del doblete de isoenzimas asignado a AChi40 en la primera etapa de cromatofoco de la purificación de AChi26. (A) SDS-PAGE de las isoenzimas AChi40a y AChi40b. 1) Patrón de masa molecular, 2) Fracción 21 (AChi40a), 3) Fracción 22 (AChi40b). Las proteínas purificadas (2 μ g) fueron separados mediante en un gel con un 13,5 % poliacrilamida y teñidas con Azul de Coomassie Brilliant Blue R-250. (B) Inmunoensayo (2 μ g) de las isoenzimas AChi40a (carril 4) y AChi40b (carril 5) y detección con anticuerpos de tabaco frente a proteínas PR-Q (quitinasa). Las fracciones analizadas fueron obtenidas a lo largo del proceso de aislamiento por cromatofoco de la isoenzima AChi26 (Fig. 33).

Tabla 15. Propiedades fisicoquímicas de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa extraídas del mesocarpo de chirimoya tratada o no tratada con altas concentraciones de CO₂ durante su conservación 6°C o madurando a 20 °C

Quitinasa	Isoenzima	<i>Mr</i> (kDa) ^x	<i>pI</i> ^y
Ácida	AChi70	70,2 \pm 0,8 ^z	4,55 \pm 0,04
	AChi48	48,5 \pm 0,2	4,43 \pm 0,07
	AChi40	40,3 \pm 0,6	4,81 \pm 0,09
	<i>AChi40a</i>	42,5 \pm 0,8	4,85 \pm 0,04
	<i>AChi40b</i>	39,5 \pm 0,3	4,79 \pm 0,05
	AChi27	26,5 \pm 0,4	4,55 \pm 0,02
	AChi26	25,8 \pm 0,2	4,05 \pm 0,04
	AChi24	24,1 \pm 0,6	4,37 \pm 0,06
	AChi14	13,9 \pm 0,2	4,54 \pm 0,05
	BChi75	75,0 \pm 1,2	8,95 \pm 0,05
	BChi56	55,8 \pm 0,3	> 9,45
	BChi43	43,2 \pm 1,0	8,63 \pm 0,08
	BChi40	40,1 \pm 0,3	8,75 \pm 0,03
	BChi33	33,0 \pm 0,2	8,93 \pm 0,02
	BChi14	14,5 \pm 0,2	8,26 \pm 0,06
1,3- β -Glucanasa	Isoenzima	<i>Mr</i> (kDa)	<i>pI</i>
Ácida	AGlu75	74,8 \pm 1,4	4,11 \pm 0,06
	AGlu68	36,1 \pm 0,3	n.d
	AGlu51	51,0 \pm 0,6	n.d
	AGlu36	67,6 \pm 0,2	4,25 \pm 0,03
	AGlu19	19,2 \pm 0,6	5,25 \pm 0,07
	BGlu76	76,0 \pm 1,1	7,61 \pm 0,04
Básica	BGlu52	51,9 \pm 0,9	7,85 \pm 0,05
	BGlu43	43,1 \pm 0,5	8,05 \pm 0,08

^x Determinada por SDS-PAGE

^y Determinado por cromatofoque en una columna Mono-P HR 5/20.

^z Cada valor corresponde a la media de, al menos, tres determinaciones diferentes \pm DE.

n.d. No determinado

7.3.- Determinación de la presencia de glicosilaciones

Con el fin de detectar la presencia de glicoestructuras asociadas a las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas de mesocarpo de chirimoya, se utilizó la tinción mediante el reactivo de Schiff. Cuando 5 μ g de cada una de las proteínas purificadas fue separada mediante SDS-PAGE, transferida a una membrana de PVDF y teñida, sólo se observaron unas tenues bandas para las isoenzimas AGlu19 y AChi26 (Fig. 52). En este sentido, es conveniente remarcar que la proteína patrón, peroxidasa de rábano con un 16 % (p/p) de carbohidratos (Racusen, 1979), dio lugar a una banda con una intensidad mucho mayor que las de las enzimas detectadas. Aunque este método de detección no nos permite cuantificar el porcentaje de carbohidratos de las proteínas analizadas, la comparación de sus intensidades con el patrón nos indica que tanto AGlu19 como AChi26 presentan una débil glicosilación.

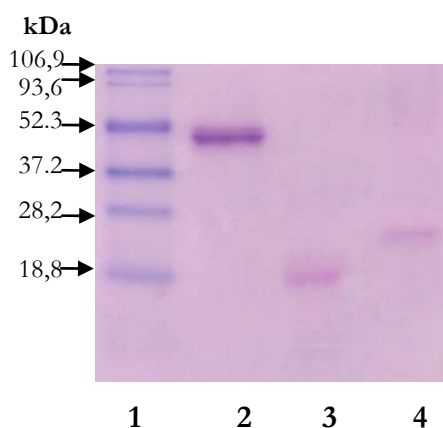


Figura 52. Detección de carbohidratos asociados a las isoenzimas AGlu19 y AChi26. Los proteínas purificadas (5 μ g) fueron separados mediante SDS-PAGE (12 % poliacrilamida), electrotransferidas a membranas de PVDF y detectados mediante el reactivo de Schiff. Carril 1, patrón masas moleculares; carril 2, peroxidasa de rábano; carril 3, AGlu19; carril 4, AChi26.

8.- Estudio cinético de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa

8.1.- Cálculo de los parámetros cinéticos

El comportamiento cinético de todas las isoenzimas purificadas de mesocarpo de chirimoyas, frente a CM-Chitin-RBV y los tres sustratos asociados al grupo fluoróforo 4-MU en el caso de la enzima quitinasa y laminarina para la enzima 1,3- β -glucanasa, se adecuó al modelo de saturación de Michaelis-Menten en las concentraciones utilizadas de cada uno de los sustratos. Aunque la representación directa de los datos parece ser el mejor sistema para calcular la K_m y la V_{max} , en el presente trabajo se optó por la representación lineal de Hanes-Wolf ($[S]/v$ frente a $[S]$) (Fig. 53-59). En este sentido, este ajuste lineal de los datos experimentales introduce un menor error en el cálculo de los parámetros cinéticos que otras representaciones utilizadas usualmente (p.ej: Lineweaver-Burk o Eadie-Hofstee), presentando una precisión cercana a la obtenida mediante la representación directa (Atkins y Nimmo, 1975).

A partir de estas constantes hemos hallado tanto la constante catalítica, calculada a través de la velocidad máxima y la concentración de enzima utilizada ($k_{\text{cat}} = V_{\text{max}} / [\text{enzima}]$), como la constante de especificidad (k_{cat}/K_m). A la vista de los resultados obtenidos, el estudio cinético de estas isoenzimas se clasificó en cuatro grupos. Así, se analizaron de forma conjunta las dos isoenzimas quitinasa ácidas de baja masa molecular (AChi24 y AChi26), en otro grupo las isoenzimas quitinasa básica y ácida BChi33 y AChi48, y en apartados diferentes las isoenzimas quitinasa básica y 1,3- β -glucanasa ácida restantes (BChi14 y AGlu19).

8.1.1.- AChi24 y AChi26

El análisis cinético mostró diferencias entre las constantes de Michaelis-Menten de estas isoenzimas ácidas cuando se utilizó como sustrato CM-Chitin-RBV (Fig. 53 y Tabla 16). Así, la afinidad de AChi24 por el sustrato coloreado fue considerablemente mayor que la calculada para la isoenzima AChi26, presentando unos valores de $K_m = 0,07 \pm 0,01$ y $0,47 \pm 0,02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectivamente. Sin embargo, en la determinación de la constante catalítica se observó que los valores eran semejantes para las dos isoenzimas ($0,79 \pm 0,01 \cdot 10^5$ y $0,85 \pm 0,05 \cdot 10^5 \Delta A_{550} \cdot \text{min}^{-1}$ respectivamente). Por otro lado, la constante de especificidad reveló que AChi24 presentaba una eficiencia 6 veces mayor en la hidrólisis de CM-Chitin-RBV que la isoenzima AChi26 (Tabla 16).

En el caso de los derivados sintéticos de NAG, mientras que la isoenzima AChi26 hidrolizó los tres sustratos utilizados, la isoenzima AChi24 degradó únicamente el disacárido y el trisacárido (Fig. 53-54). Como se observó para el sustrato coloreado, la K_m de AChi24 frente a la hidrólisis de 4-MU- β -(GlcNAc)₂ y 4-MU- β -(GlcNAc)₃ fue menor que la obtenida para AChi26 (Tabla 16). Si nos fijamos en el valor de la constante catalítica, las isoenzimas AChi24 y AChi26 presentaron valores semejantes para la hidrólisis de 4-MU- β -(GlcNAc)₂ ($4,52 \pm 0,08$ y $4,96 \pm 0,12 \text{ s}^{-1}$). Sin embargo, la isoenzima AChi24 mostró una k_{cat} frente a 4-MU- β -(GlcNAc)₃ mucho mayor ($17,56 \pm 0,42 \text{ s}^{-1}$) que la descrita para la isoenzima quitinasa ácida AChi26 ($3,89 \pm 0,16 \text{ s}^{-1}$), constatando que AChi24 cataliza 4,5 veces más rápido que AChi26 la reacción desde el complejo sustrato-enzima al producto. Si estudiamos la eficiencia catalítica de la reacción frente a 4-MU- β -(GlcNAc)₂, se puede concluir que AChi24 es aproximadamente dos veces más activa que la isoenzima AChi26 (Tabla 16). El mismo hecho fue observado cuando se utilizó un sustrato con tres moléculas de N-acetilglucosamina, con un valor de k_{cat}/K_m de la reacción enzimática para la isoenzima AChi24 ($149,38 \pm 7,34 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$) significativamente ($P \leq 0,05$) superior que la calculada para la isoenzima AChi26 ($27,49 \pm 1,88 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$). En la determinación de los parámetros cinéticos asociados a la hidrólisis de 4-MU- β -GlcNAc por parte de AChi26, se constató la disparidad de sus valores con los descritos para los sustratos de mayor tamaño. En este sentido, esta isoenzima catalizó de una forma más efectiva la degradación del monosacárido, llegando a duplicar los valores de la k_{cat} descritos para el disacárido y trisacárido (Fig. 55 y Tabla 16).

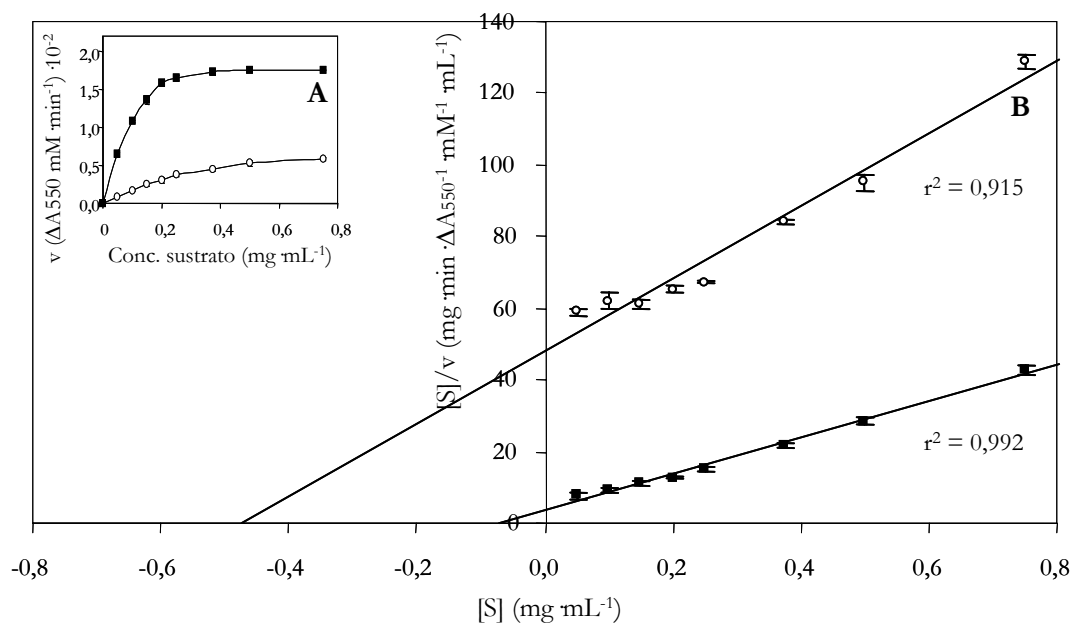


Figura 53. Análisis cinético frente a CM-Chitin-RBV de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya AChi24 (■) y AChi26 (○). (A) Variación de la actividad enzimática con la concentración de sustrato. (B) Cálculo de K_m y V_{\max} mediante la representación de Hanes-Wolf. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

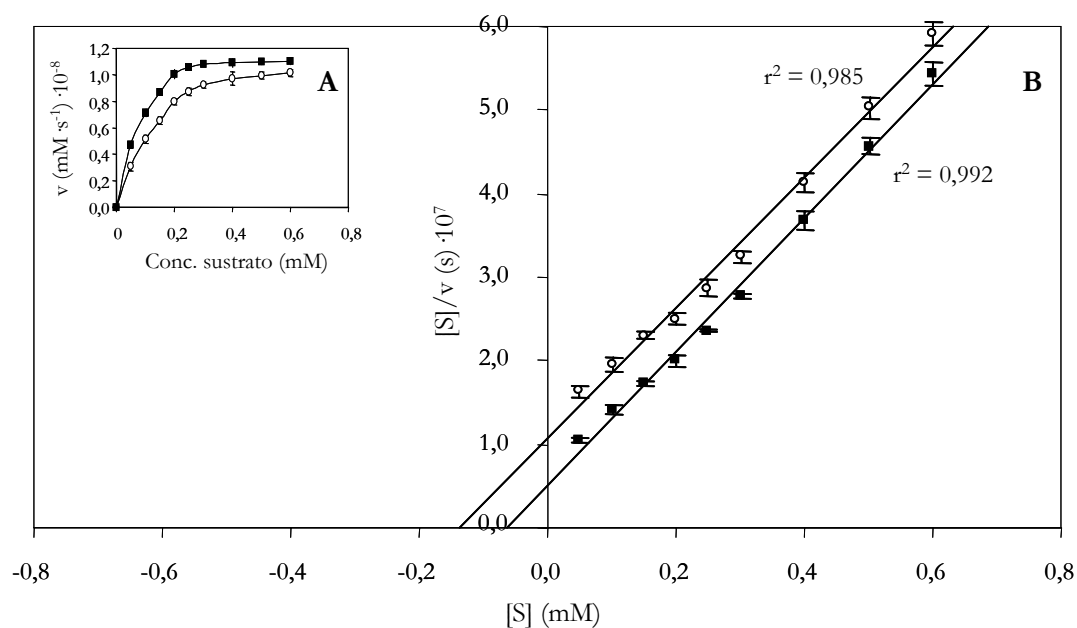


Figura 54. Análisis cinético frente a 4-MU- β -(GlcNAc)₂ de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya AChi24 (■) y AChi26 (○). (A) Variación de la actividad enzimática con la concentración de sustrato. (B) Cálculo de K_m y V_{\max} mediante la representación de Hanes-Wolf. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

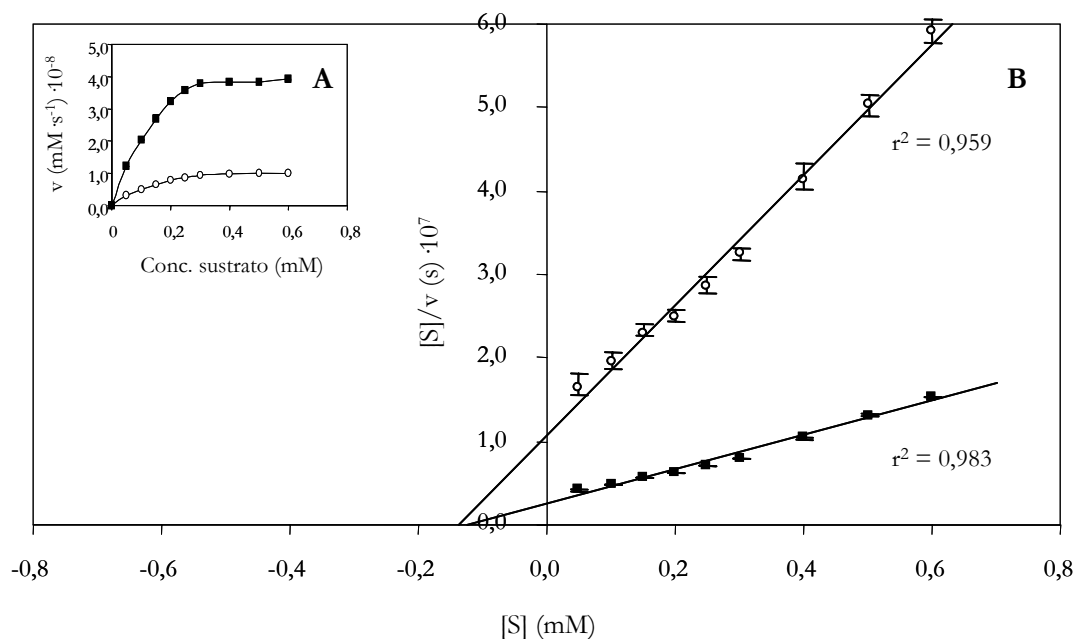


Figura 55. Análisis cinético frente a 4-MU- β -(GlcNAc)₃ de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya AChi24 (■) y AChi26 (○). (A) Variación de la actividad enzimática con la concentración de sustrato. (B) Cálculo de K_m y V_{max} mediante la representación de Hanes-Wolf. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

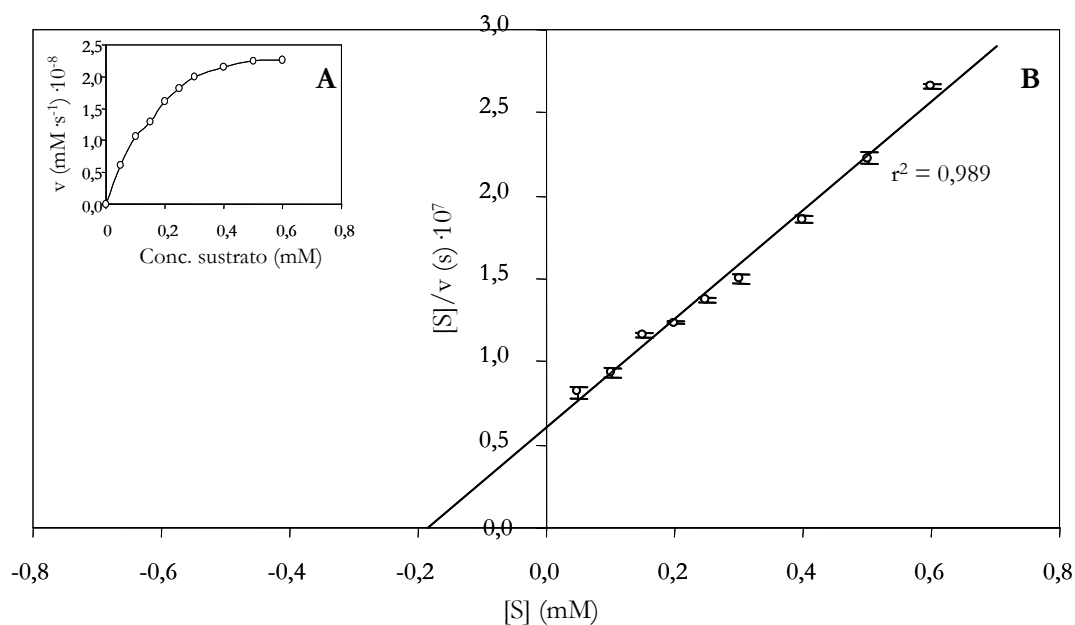


Figura 56. Análisis cinético frente a 4-MU- β -GlcNAc de la isoenzima quitinasa purificada de mesocarpio de chirimoya AChi26 (○). (A) Variación de la actividad enzimática con la concentración de sustrato. (B) Cálculo de K_m y V_{max} mediante la representación de Hanes-Wolf. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

8.1.2.- BChi33 y AChi48

Aunque aparentemente todas las isoenzimas presentaron una cinética frente a la hidrólisis de CM-Chitin-RBV que seguía el modelo de Michaelis-Menten, las representaciones de Hanes-Wolf de las isoenzima BChi33 y AChi48 presentaron un perfil curvado y no lineal como era esperable. Así, en ambas representaciones de $[S]/v$ frente a $[S]$ los puntos se ajustaron a una línea curva convexa en el intervalo de concentraciones estudiado, aproximándose a una línea horizontal en la intersección con el eje $[S]/v$ en el valor de $[S]/V_{\max}$ (Fig. 57-59). Las dos zonas de la curva, siendo el límite entre ellas una concentración de sustrato de $0,15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, fueron ajustadas a líneas rectas, obteniendo diferentes parámetros cinéticos de las isoenzima BChi33 y AChi48 cuando éstas catalizaban la hidrólisis de CM-Chitin-RBV a bajas o altas concentraciones (Fig. 57, Tabla 16). Tras estimar la K_m por extrapolación, se observó que BChi33 presentaba una mayor afinidad por el sustrato a altas concentraciones de éste ($K_m^A = 0,09 \pm 0,01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $K_m^B = 0,87 \pm 0,04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Un comportamiento semejante, aunque menos acentuado, fue encontrado en la isoenzima AChi48 ($K_m^A = 0,17 \pm 0,01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $K_m^B = 0,58 \pm 0,02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). En contraste con este fenómeno, los valores de la k_{cat} fueron entre dos y cuatro veces menores a altas que a bajas concentraciones de CM-Chitin-RBV para BChi33 y AChi48 ($k_{\text{cat}}^A = 1,29 \pm 0,01 \cdot 10^5 \Delta A_{550} \cdot \text{min}^{-1}$, $k_{\text{cat}}^B = 5,00 \pm 1,95 \cdot 10^5 \Delta A_{550} \cdot \text{min}^{-1}$; $k_{\text{cat}}^A = 1,20 \pm 0,01 \cdot 10^5 \Delta A_{550} \cdot \text{min}^{-1}$, $k_{\text{cat}}^B = 2,55 \pm 0,04 \cdot 10^5 \Delta A_{550} \cdot \text{min}^{-1}$ respectivamente). Por otro lado, el cálculo de la constante de especificidad demostró que tanto la isoenzima BChi33 como AChi48 presentaron unos valores superiores de eficiencia catalítica cuando actuaban en el rango de altas concentraciones, siendo mucho más efectiva en todo el rango de concentraciones estudiado la hidrólisis por parte de BChi33 que la catalizada por la isoenzima AChi48 ($k_{\text{cat}}/K_m^A = 13,25 \pm 0,63 \cdot 10^5 \Delta A_{550} \cdot \text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m^B = 5,73 \pm 1,26 \cdot 10^5 \Delta A_{550} \cdot \text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$; $k_{\text{cat}}/K_m^A = 6,86 \pm 0,36 \cdot 10^5 \Delta A_{550} \cdot \text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m^B = 4,29 \pm 0,47 \cdot 10^5 \Delta A_{550} \cdot \text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ respectivamente).

En el caso de los sustratos asociados al grupo fluoróforo 4-MU, se observó un perfil bifásico similar al del sustrato coloreado en la representación de la velocidad de hidrólisis frente a la concentración de 4-MU- β -(GlcNAc)₂ y 4-MU- β -(GlcNAc)₃ (Fig. 58 y 59, respectivamente). Aplicando la metodología usada anteriormente, se calcularon las diferentes constantes cinéticas de estas dos isoenzimas a altas y bajas concentraciones de sustrato, estableciendo el punto de inflexión de la curva en $0,15 \text{ mM}$. Los valores de K_m de BChi33 y AChi48 utilizando 4-MU- β -(GlcNAc)₂ fueron considerablemente mayores a bajas concentraciones de sustrato ($0,66 \pm 0,02$ y $1,00 \pm 0,01 \text{ mM}$, respectivamente) que a altas concentraciones ($0,10 \pm 0,01$ y $0,19 \pm 0,02 \text{ mM}$, respectivamente), siguiendo la misma pauta que la observada para CM-Chitin-RBV. La determinación de la constante catalítica mostró que las enzimas BChi33 y AChi48 hidrolizaban el disacárido entre dos y tres veces más rápido a bajas que a altas concentraciones de 4-MU- β -(GlcNAc)₂ ($k_{\text{cat}}^B = 33,40 \pm 7,13 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}^A = 11,99 \pm 0,40 \text{ s}^{-1}$; $k_{\text{cat}}^B = 65,45 \pm 5,36 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}^A = 22,86 \pm 1,23 \text{ s}^{-1}$ respectivamente). Teniendo en cuenta estas diferencias entre los parámetros cinéticos, el análisis de la constante de especificidad indicó que las isoenzima BChi33 y AChi48 catalizaban de una forma más eficiente el sustrato 4-MU- β -(GlcNAc)₂ a altas que a bajas concentraciones,

presentando una efectividad similar entre ellas en ambas zonas de la curva ($k_{\text{cat}}/K_m^A = 119,57 \pm 9,56 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m^B = 50,61 \pm 6,27 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$; $k_{\text{cat}}/K_m^A = 116,32 \pm 8,96 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m^B = 65,45 \pm 2,98 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ respectivamente). La estimación de los parámetros cinéticos a partir de los datos experimentales de la hidrólisis de 4-MU- β -(GlcNAc)₃ reflejaron unos resultados que siguieron un patrón similar al del anterior sustrato analizado. Así, BChi33 y AChi48 presentaron una mayor afinidad por el trisacárido a altas concentraciones ($K_m^A = 0,05 \pm 0,00 \text{ mM}$, $K_m^B = 0,38 \pm 0,02 \text{ mM}$; $K_m^A = 0,21 \pm 0,02 \text{ mM}$, $K_m^B = 0,49 \pm 0,03 \text{ mM}$ respectivamente) e hidrolizaron éste de manera más rápida a bajas concentraciones ($k_{\text{cat}}^B = 54,46 \pm 8,29 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}^A = 20,88 \pm 1,39 \text{ s}^{-1}$; $k_{\text{cat}}^B = 16,00 \pm 3,91 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}^A = 10,07 \pm 0,51 \text{ s}^{-1}$ respectivamente). En este sentido, resultó lógico que la enzima BChi33 mostrase una mayor constante de especificidad a altas que a bajas concentraciones de sustrato ($k_{\text{cat}}/K_m^A = 451,35 \pm 27,24 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m^B = 143,14 \pm 13,96 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$). Aunque la efectividad catalítica de AChi48 fue también mayor a altas concentraciones de 4-MU- β -(GlcNAc)₃ ($k_{\text{cat}}/K_m^A = 48,06 \pm 3,36 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m^B = 32,73 \pm 4,89 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$), ésta fue sensiblemente inferior a la calculada para BChi33. Por último, y con respecto al monosacárido 4-MU- β -GlcNAc, no se detectó la hidrólisis de este compuesto por parte de la isoenzimas BChi33 y AChi48.

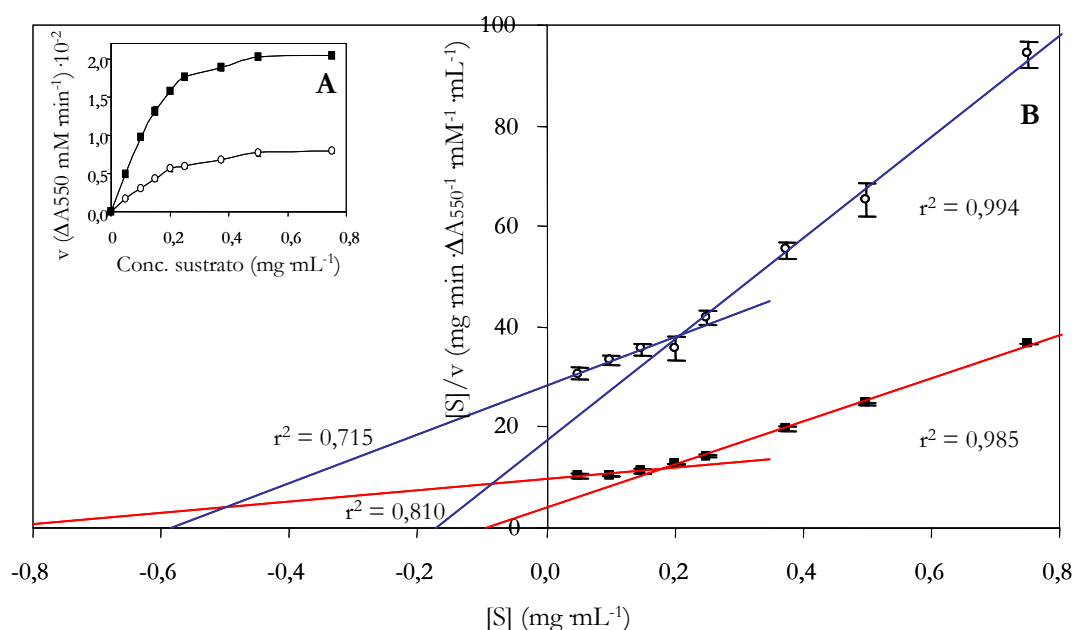


Figura 57. Análisis cinético frente a CM-Chitin-RBV de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya BChi33 (■) y AChi48 (○). (A) Variación de la actividad enzimática con la concentración de sustrato. (B) Cálculo de K_m y V_{max} mediante la representación de Hanes-Wolf para BChi33 (—) y AChi48 (—). Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

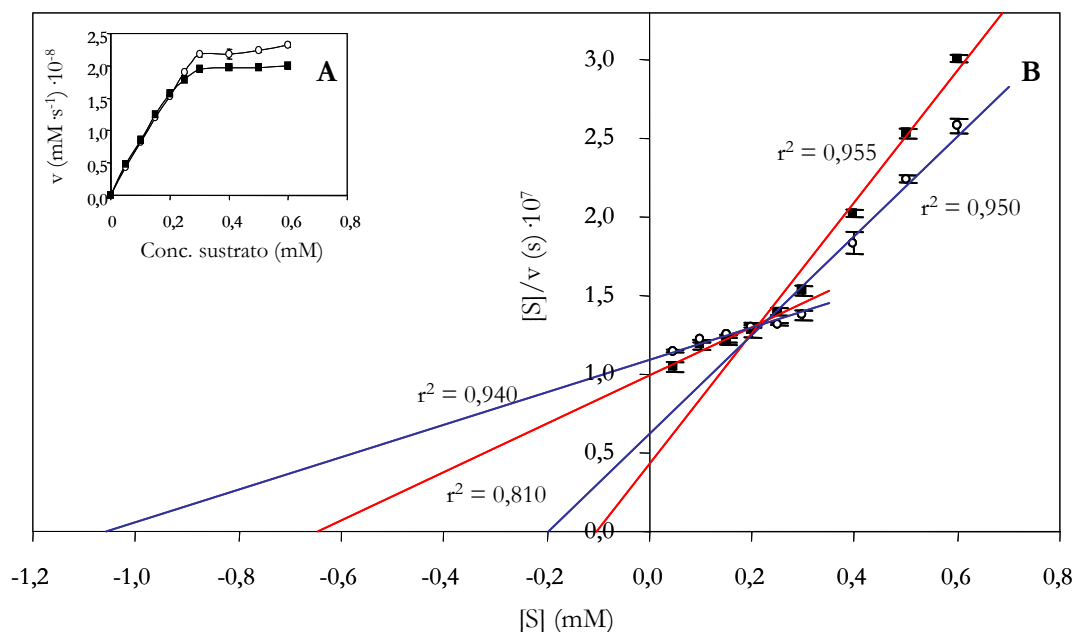


Figura 58. Análisis cinético frente a 4-MU- β -(GlcNAc)₂ de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocorpo de chirimoya BChi33 (■) y AChi48 (○). (A) Variación de la actividad enzimática con la concentración de sustrato. (B) Cálculo de K_m y V_{max} mediante la representación de Hanes-Wolf para BChi33 (—) y AChi48 (—). Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

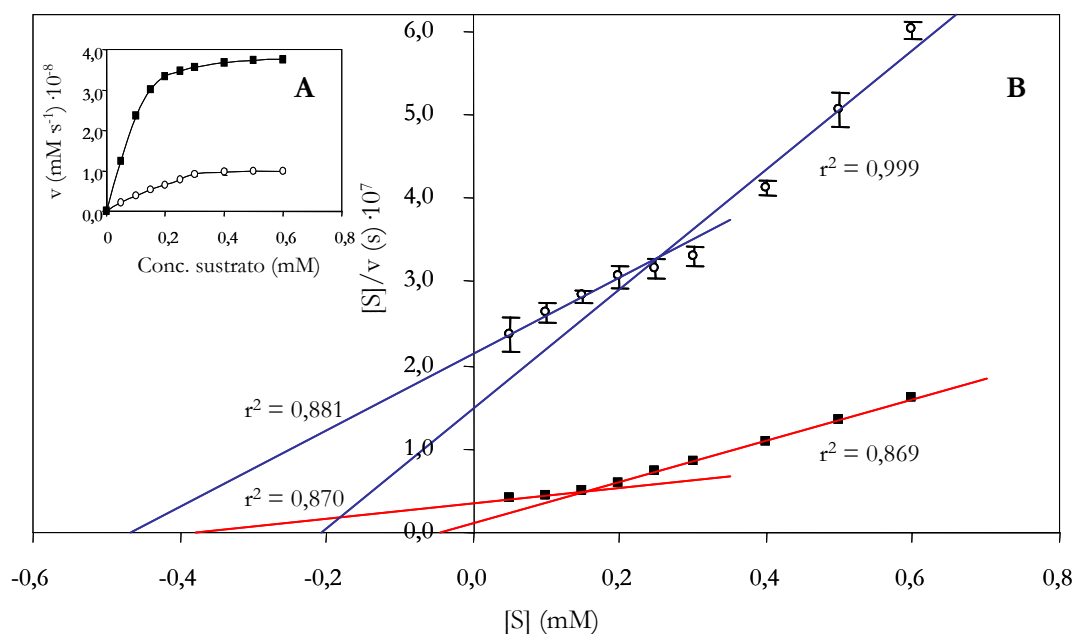


Figura 59. Análisis cinético frente a 4-MU- β -(GlcNAc)₃ de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocorpo de chirimoya, BChi33 (■) y AChi48 (○). (A) Variación de la actividad enzimática con la concentración de sustrato. (B) Cálculo de K_m y V_{max} mediante la representación de Hanes-Wolf para BChi33 (—) y AChi48 (—). Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

Puesto que teóricamente este tipo de representación de Hanes-Wolf, derivada de la curva de velocidad de esta enzima frente a los tres sustratos hidrolizados, implica la presencia de una cinética no Michaeliana, se ajustaron los datos experimentales a la ecuación de Hill (Segel, 1993), con el fin de calcular el valor del coeficiente de Hill (h). Esta ecuación puede transformarse linealmente:

$$\log \frac{v}{V_{\max} - v} = h \cdot \log[S] - \log K'$$

representando v a la velocidad inicial de la reacción en el estado estacionario, V_{\max} a la velocidad máxima de la reacción, h al valor del coeficiente de Hill, $[S]$ a la concentración de sustrato y K' a una constante resultado del producto de la constante intrínseca de disociación del complejo enzima-sustrato (K_s) con los factores de interacción asociados a los diferentes sitios de unión de la enzima.

De acuerdo a los parámetros extrapolados de las Figuras 60, 61 y 62, se observó que el valor de h fue mayor de 1 para los tres sustratos hidrolizables (Tabla 12). Estos resultados implicaron que la enzima BChi33 posee al menos $1,27 \pm 0,05$, $1,45 \pm 0,01$ o $1,43 \pm 0,05$ sitios de unión teóricos con una fuerte cooperatividad positiva frente a CM-Chitin-RBV, 4-MU- β -(GlcNAc)₂ y 4-MU- β -(GlcNAc)₃ respectivamente. La cooperatividad positiva de la isoenzima AChi48 fue menor que la de la isoenzima básica a tenor de los valores de h para los tres sustratos anteriores ($1,18 \pm 0,05$, $1,23 \pm 0,06$ o $1,16 \pm 0,05$ sitios de unión teóricos). Sin embargo, tal y como se discutirá en las páginas 232 y 233, desde un contexto puramente cinético un valor del coeficiente de Hill mayor que 1 no implica necesariamente una cuantificación del número de centros catalíticos por molécula de enzima. Lo que sí se puede afirmar, siguiendo las recomendaciones de la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (NC-IUB, 1981), es que los valores de h para las isoenzimas BChi33 y AChi48 indicarían que su comportamiento catalítico refleja la denominada cooperatividad cinética positiva.

Es un hecho bien conocido que la cooperatividad en sentido estricto no puede tener lugar en una enzima monomérica (como son las isoenzimas BChi33 y AChi48), puesto que la cooperación requiere la existencia de múltiples sitios de unión. Sin embargo, desde un punto de vista operativo se puede asumir la existencia de la cooperatividad en esta clase de enzimas en condiciones de no-equilibrio. Como hemos indicado anteriormente, ésta se denomina cooperatividad cinética y se define como un tipo de desviación de la cinética de Michaelis-Menten (Cornish-Bowden y Cardenas, 1987; Ricard y Cornish-Bowden, 1987).

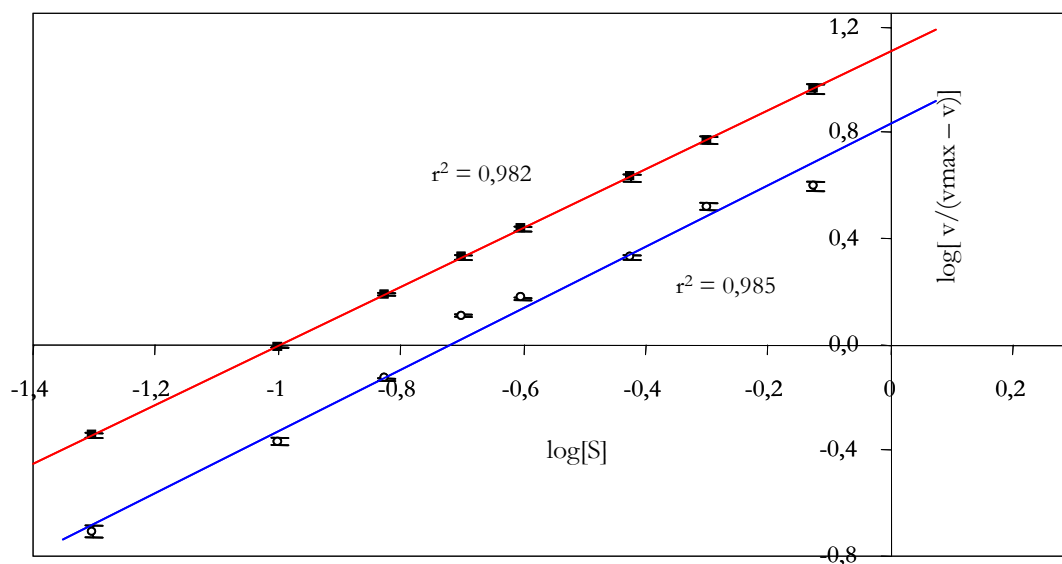


Figura 60. Representación de Hill frente a CM-Chitin-RBV de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya BChi33 (■ —) y AChi48 (○ —). Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

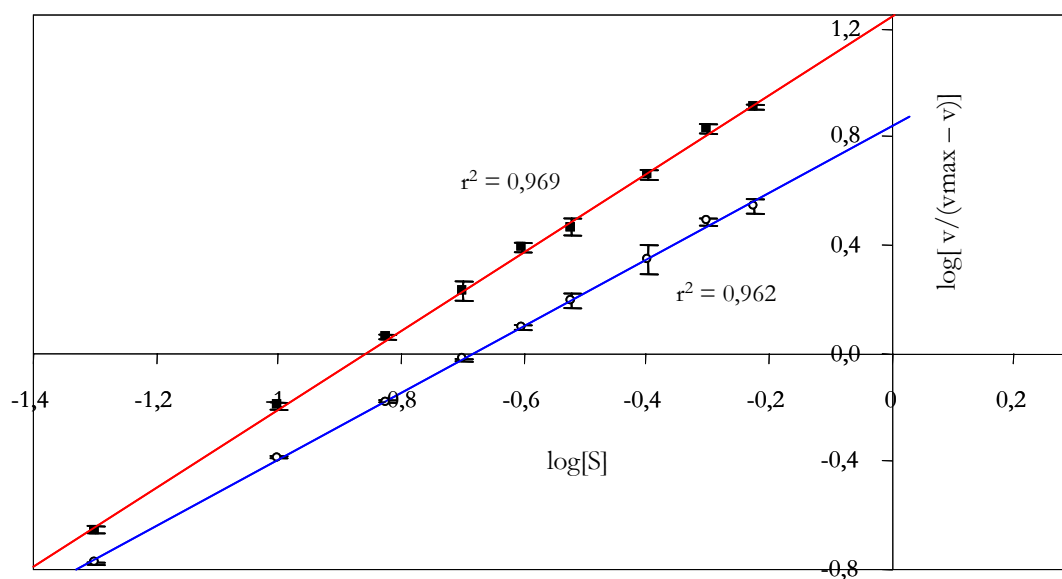


Figura 61. Representación de Hill frente a 4-MU- β -(GlcNAc)₂ de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya BChi33 (■ —) y AChi48 (○ —). Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

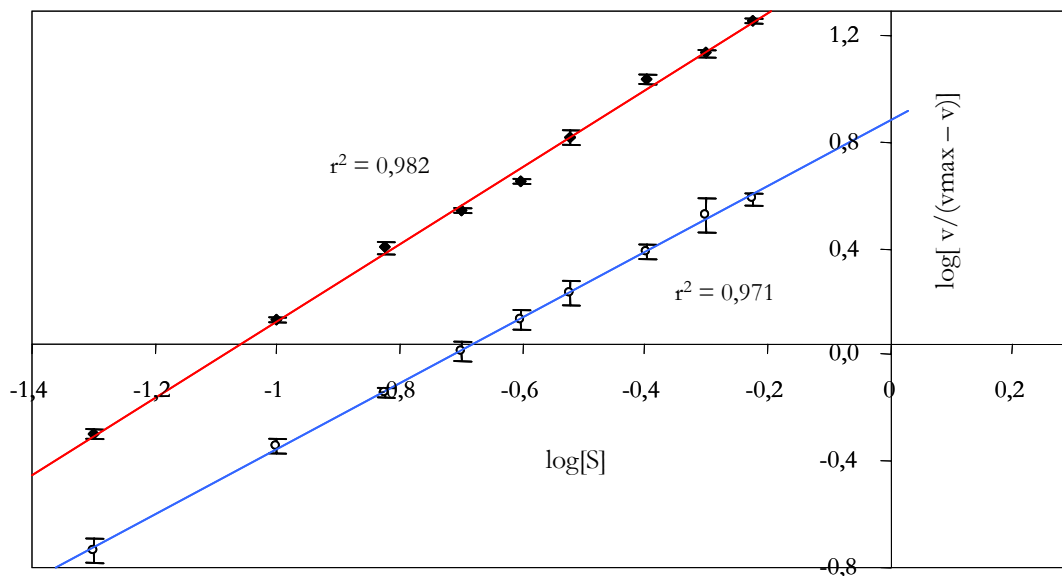


Figura 62. Representación de Hill frente a 4-MU- β -(GlcNAc)₃ de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya BChi33 (■ —) y AChi48 (○ —). Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

Existen dos métodos principales (Ricard *et al.*, 1974; Neet, 1980; Ricard y Noat, 1985) para cuantificar la extensión de la cooperatividad cinética: uno de ellos se basa en la medida empírica del coeficiente cinético de Hill extremo (b_{ext}) y, el otro utiliza la determinación de la amplitud de la curvatura de la representación recíproca de la curva de velocidad específica cuando el valor de la ordenada tiende a 0 (parámetro I'). De este modo, la ecuación de velocidad tendría la siguiente forma:

$$\frac{[E]}{v} = \frac{\frac{1}{[S]^2} + a_0 \cdot \frac{1}{[S]} + b_0}{c_0 \cdot \frac{1}{[S]} + d_0}$$

donde v es la velocidad inicial de la reacción en el estado estacionario, $[E]$ es la concentración total de enzima, $[S]$ la concentración de sustrato y a_0 , b_0 , c_0 , d_0 los parámetros cinéticos que agrupan las constantes de velocidad. La estimación de estos parámetros se puede hacer de un modo gráfico trazando una recta asíntota (cuando $1/[S] \rightarrow \infty$) y una recta tangente (cuando $1/[S] \rightarrow 0$) en la representación recíproca con perfil cóncavo (Nari *et al.*, 1974). Estas rectas se expresarían con las siguientes fórmulas:

$$\left(\frac{[E_0]}{v}\right)^A = \phi_0^A + \frac{\phi_1^A}{[S]} \quad \text{cuando} \quad \frac{1}{[S]} \rightarrow \infty$$

$$\left(\frac{[E_0]}{v}\right)^T = \phi_0^T + \frac{\phi_1^T}{[S]} \quad \text{cuando} \quad \frac{1}{[S]} \rightarrow 0$$

Los valores de los coeficientes de las rectas (ϕ), junto a los de las coordenadas de la intersección de ambas rectas (I_s y I_v), nos permiten deducir los parámetros cinéticos de acuerdo a:

$$a_0 = \frac{I_v}{\phi_1^A} \quad b_0 = \frac{\phi_0^T}{\phi_1^A} \cdot I_s \quad c_0 = \frac{1}{\phi_1^A} \quad d_0 = \frac{I_s}{\phi_1^A}$$

El cálculo de la extensión de la cooperatividad mediante el parámetro Γ es expresado a través de la segunda derivada de la ecuación de velocidad para $1/[S] \rightarrow 0$:

$$\Gamma = \lim_{\frac{1}{[S]} \rightarrow 0} \frac{d^2 \left(\frac{[E_0]}{v} \right)}{d \left(\frac{1}{[S]} \right)^2} = \frac{2 \cdot (d^2 - c \cdot (a \cdot d - b \cdot c))}{d^3}$$

Por tanto, la determinación del parámetro Γ requiere el cálculo de los parámetros cinéticos a_0 , b_0 , c_0 , d_0 , expresándose en $s \cdot M^2$ para los quitoooligosacáridos fluorogénicos y en $s \cdot (mg/mL)^2$ para CM-Chitin-RBV. Por otro lado, el coeficiente cinético de Hill extremo se puede expresar teniendo en cuenta los valores de alguno de los parámetros anteriores:

$$h_{ext} = \frac{2}{1 + \sqrt{1 - \frac{d_0 \cdot \Gamma}{2}}}$$

Así, tras analizar gráficamente las representaciones recíprocas de las isoenzimas BChi33 y AChi48 frente a CM-Chitin-RBV, 4-MU- β -(GlcNAc)₂ y 4-MU- β -(GlcNAc)₃ se pudo constatar que exhibían una significativa convexidad, la cual es una señal indicativa de su cooperatividad positiva cinética (Fig. 63-65). En base a los valores de los parámetros Γ y h_{ext} para estas dos isoenzimas se puede constatar que la desviación del mecanismo Michaeliano observado en estas últimas figuras está originada en una clara cooperatividad cinética positiva (Tabla 17). Para llegar a esta conclusión seguimos los criterios expuestos por Ricard *et al.* (1984). Así, cuando $\Gamma = 0$ y $h_{ext} = 1$ se habla de no-cooperatividad; si $\Gamma > 0$ y $2 \geq h_{ext} > 1$ se trata de cooperatividad positiva; y para $\Gamma = 0$ y $0 < h_{ext} < 1$ nos encontramos con cooperatividad negativa. Por otro lado, la amplitud observada en los valores del parámetro Γ para los diferentes sustratos está originada en su naturaleza dimensional. Este factor, junto a la desventaja de no variar en un intervalo fijo, lo hacen poseedor de una escasa significancia intuitiva en la cuantificación de la extensión de la cooperatividad. Por estas razones, se prefiere la utilización del parámetro h_{ext} en la evaluación cuantitativa de la cooperatividad, ya que tiene una naturaleza adimensional y su valor varía en un intervalo fijo (0-2), proporcionando un mayor significado intuitivo. En este sentido, los valores de h_{ext} indican que la isoenzima BChi33 presenta una cooperatividad cinética positiva más marcada que la calculada para la isoenzima AChi48, y que la tendencia seguida por ambas enzimas es idéntica en lo que respecta a los diferentes sustratos: la magnitud de la cooperatividad

disminuye con la masa molecular del compuesto, siendo máxima para 4-MU- β -(GlcNAc)₂ y mínima para CM-Chitin-RBV (Tabla 17).

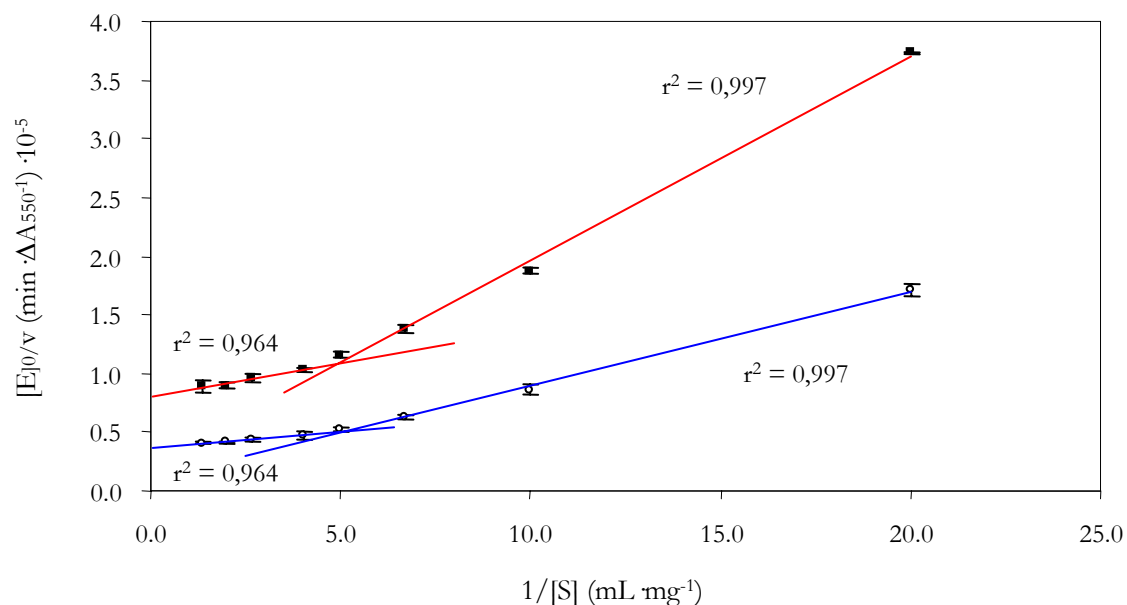


Figura 63. Representación recíproca de la velocidad específica frente a CM-Chitin-RBV de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya BChi33 (■ —) y AChi48 (○ —). Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

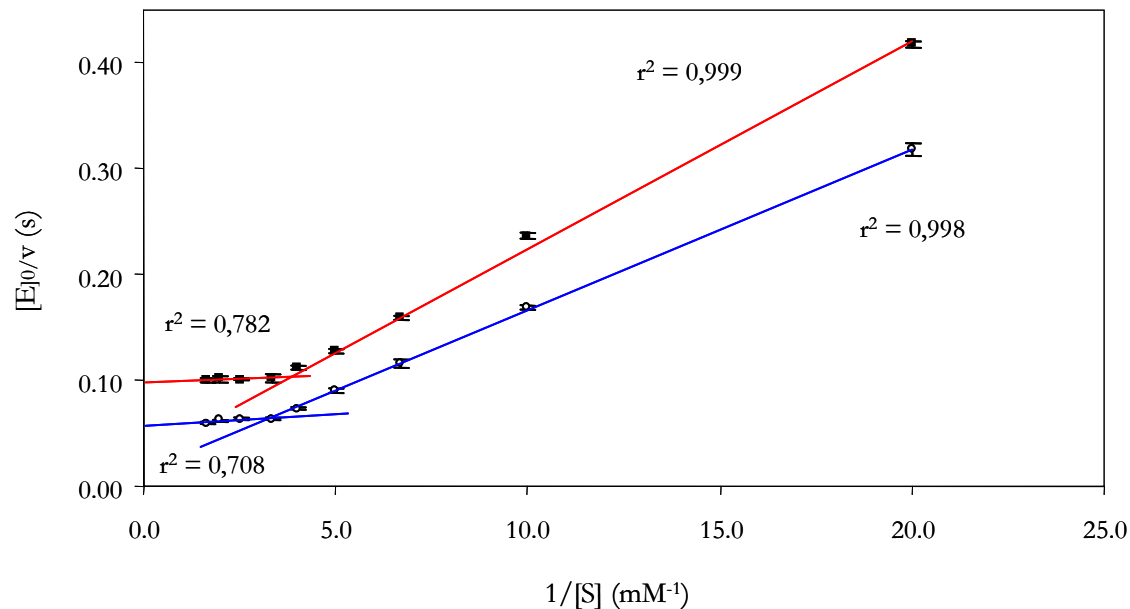


Figura 64. Representación recíproca de la velocidad específica frente a 4-MU- β -(GlcNAc)₂ de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya BChi33 (■ —) y AChi48 (○ —). Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

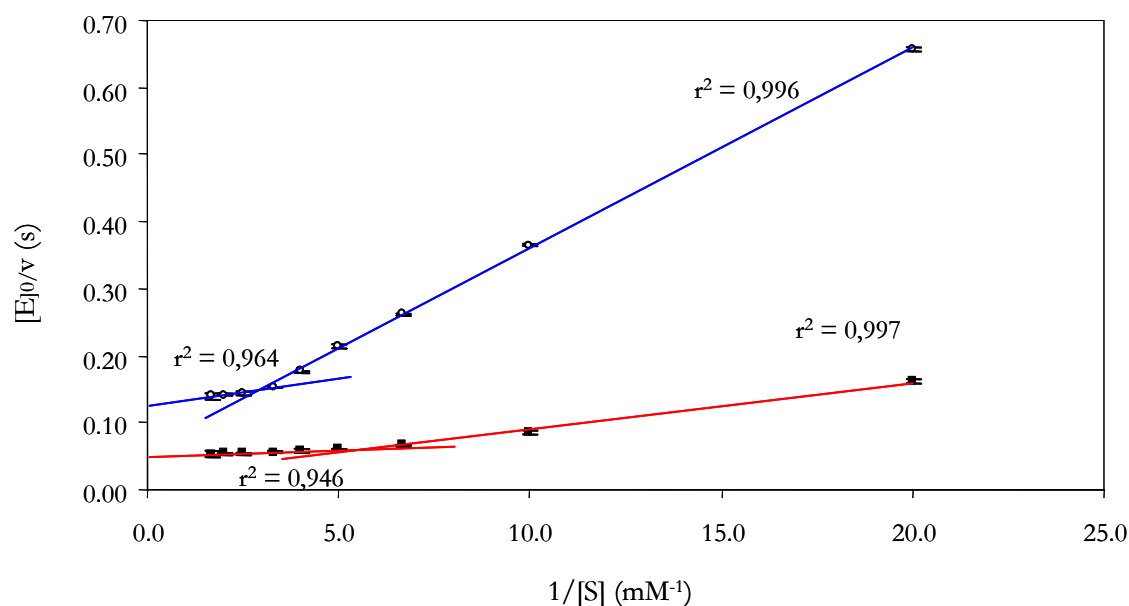


Figura 65. Representación recíproca de la velocidad específica frente a 4-MU- β -(GlcNAc)₃ de las isoenzimas quitinasa purificadas de mesocarpio de chirimoya BChi33 (■) y AChi48 (○). Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

8.1.3.- BChi14

En el cálculo de las constantes cinéticas de la reacción hidrólisis de CM-Chitin-RBV por parte de la isoenzima BChi14, se obtuvo una K_m de $0,28 \pm 0,01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ y una k_{cat} de $0,22 \pm 0,01 \cdot 10^5 \Delta A_{550} \cdot \text{min}^{-1}$ (Fig. 66). El valor de la constante de especificidad para esta enzima, $k_{\text{cat}}/K_m = 0,79 \pm 0,03 \cdot 10^5 \Delta A_{550} \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, fue considerablemente inferior al observado en el resto de isoenzimas quitinasa purificadas frente a este sustrato (Tabla 16). Por otro lado, esta isoenzima sólo hidrolizó dos de los sustratos sintéticos que presentaban el grupo fluoróforo, 4-MU- β -(GlcNAc)₂ y 4-MU- β -(GlcNAc)₃ (Fig. 67 y 68 respectivamente). Así, mientras BChi14 presentaba una mayor afinidad por el disacárido ($K_m = 0,09 \pm 0,01 \text{ mM}$) que por el trisacárido ($K_m = 0,18 \pm 0,01 \text{ mM}$), esta enzima hidrolizó aproximadamente 2,5 veces más rápido el sustrato de mayor grado de polimerización ($k_{\text{cat}} = 6,93 \pm 0,18 \text{ s}^{-1}$) que el compuesto 4-MU- β -(GlcNAc)₂ ($k_{\text{cat}} = 2,87 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$). A la vista de estos valores, y tras calcular la constante de especificidad k_{cat}/K_m , es evidente que BChi14 presenta una eficiencia catalítica significativamente mayor ($P \leq 0,05$) utilizando 4-MU- β -(GlcNAc)₃ que 4-MU- β -(GlcNAc)₂ ($38,67 \pm 1,47$ y $33,23 \pm 1,35 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ respectivamente).

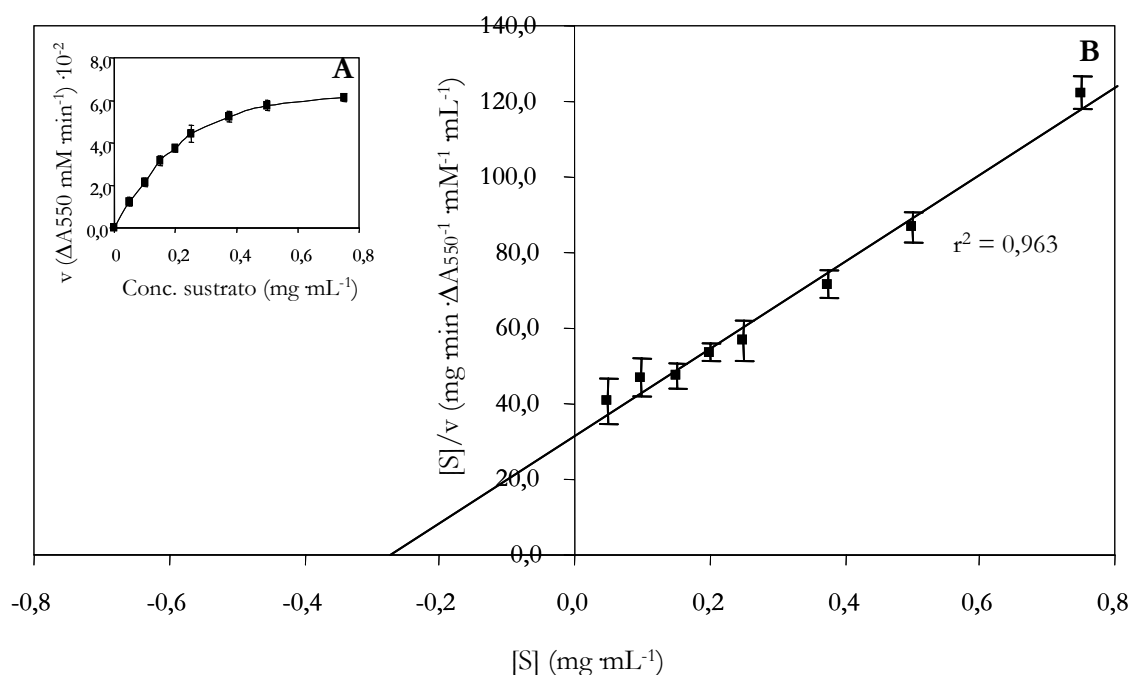


Figura 66. Análisis cinético frente a CM-Chitin-RBV de la isoenzima quitinasa purificada de mesocarpio de chirimoya BChi14 (■). (A) Variación de la actividad enzimática con la concentración de sustrato. (B) Cálculo de K_m y V_{max} mediante la representación de Hanes-Wolf. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

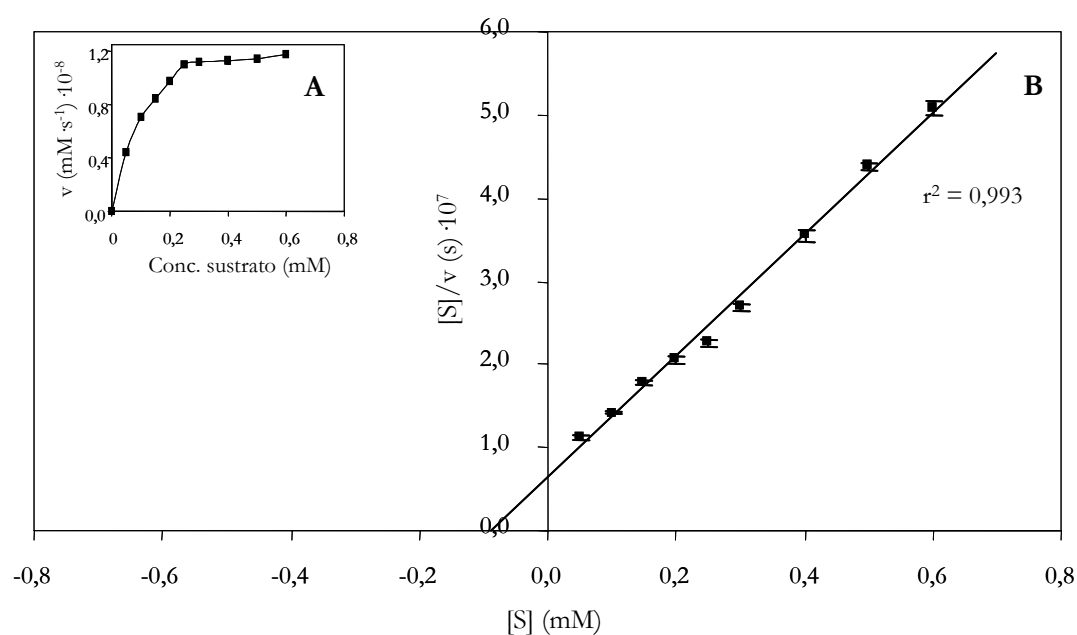


Figura 67. Análisis cinético frente a 4-MU- β -(GlcNAc) $_2$ de la isoenzima quitinasa purificada de mesocarpio de chirimoya BChi14 (■). (A) Variación de la actividad enzimática con la concentración de sustrato. (B) Cálculo de K_m y V_{max} mediante la representación de Hanes-Wolf. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

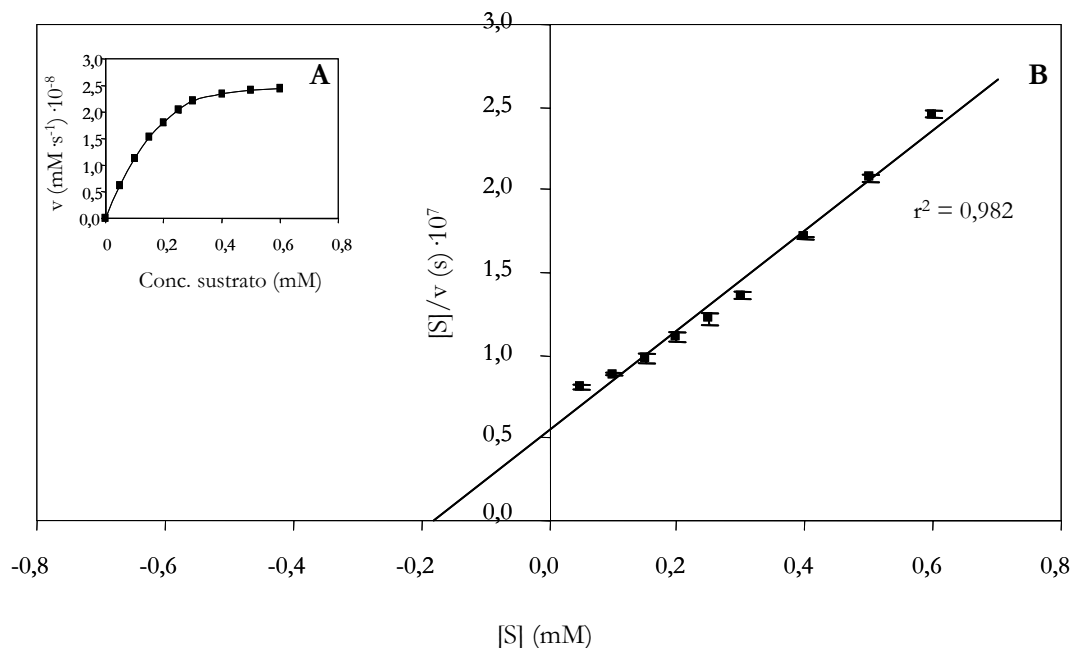


Figura 68. Análisis cinético frente a 4-MU- β -(GlcNAc) $_3$ de la isoenzima quitinasa purificada de mesocarpio de chirimoya BChi14 (■). (A) Variación de la actividad enzimática con la concentración de sustrato. (B) Cálculo de K_m y V_{max} mediante la representación de Hanes-Wolf. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

8.1.4.- AGlu19

La isoenzima purificada 1,3- β -glucanasa AGlu19 presentó una K_m frente a laminarina de *Laminaria digitata* de $0,32 \pm 0,03 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, la cual suponiendo un grado de polimerización de 25 y una masa molecular de $4000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Villa *et al.* 1976), corresponde a una concentración de sustrato de $0,08 \pm 0,01 \text{ mM}$. La constante catalítica k_{cat} de esta enzima fue de $3,10 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$ y su constante de especificidad k_{cat}/K_m mostró un valor de $9,57 \pm 0,47 \text{ mL mg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ o $38,27 \pm 1,90 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ (Fig. 69, Tabla 18).

Tabla 16. Propiedades cinéticas de las isoenzimas quitinasa purificadas del mesocarpio de chirimoya

Isoenzima	Parametro ^y	Sustrato			
		CM-Chitin-RBV	4-MU-β-GlcNAc	4-MU-β-(GlcNAc) ₂	4-MU-β-(GlcNAc) ₃
AChi48 <i>Baja [Sustrato]^x</i>	K_m^B	0,58 ± 0,02	n.d	1,00 ± 0,01	0,49 ± 0,03
	k_{cat}^B	2,55 ± 0,04 · 10 ⁵	n.d	65,45 ± 5,36	16,00 ± 3,91
	k_{cat}/K_m^B	4,29 ± 0,47 · 10 ⁵	n.d	65,45 ± 2,98	32,73 ± 4,89
AChi48 <i>Alta [Sustrato]</i>	K_m^A	0,17 ± 0,01	n.d	0,19 ± 0,02	0,21 ± 0,02
	k_{cat}^A	1,20 ± 0,01 · 10 ⁵	n.d	22,86 ± 1,23	10,07 ± 0,51
	k_{cat}/K_m^A	6,86 ± 0,36 · 10 ⁵	n.d	116,32 ± 8,96	48,06 ± 3,36
AChi26	K_m	0,47 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01
	k_{cat}	0,85 ± 0,05 · 10 ⁵	11,80 ± 0,25	4,96 ± 0,12	3,89 ± 0,16
	k_{cat}/K_m	1,80 ± 0,10 · 10 ⁵	64,39 ± 0,03	36,13 ± 1,50	27,49 ± 1,88
AChi24	K_m	0,07 ± 0,01	n.d	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,01
	k_{cat}	0,79 ± 0,01 · 10 ⁵	n.d	4,52 ± 0,08	17,56 ± 0,42
	k_{cat}/K_m	11,40 ± 0,71 · 10 ⁵	n.d	71,88 ± 3,97	149,38 ± 7,34
BChi33 <i>Baja [Sustrato]</i>	K_m^B	0,87 ± 0,04	n.d	0,66 ± 0,02	0,38 ± 0,02
	k_{cat}^B	5,00 ± 1,95 · 10 ⁵	n.d	33,40 ± 7,13	54,46 ± 8,29
	k_{cat}/K_m^B	5,73 ± 1,26 · 10 ⁵	n.d	50,61 ± 6,27	143,14 ± 13,96
BChi33 <i>Alta [Sustrato]</i>	K_m^A	0,09 ± 0,01	n.d	0,10 ± 0,01	0,05 ± 0,00
	k_{cat}^A	1,29 ± 0,01 · 10 ⁵	n.d	11,99 ± 0,40	20,88 ± 1,39
	k_{cat}/K_m^A	13,25 ± 0,63 · 10 ⁵	n.d	119,57 ± 9,56	451,35 ± 27,24
BChi14	K_m	0,28 ± 0,01	n.d	0,09 ± 0,01	0,18 ± 0,01
	k_{cat}	0,22 ± 0,01 · 10 ⁵	n.d	2,87 ± 0,05	6,93 ± 0,18
	k_{cat}/K_m	0,79 ± 0,03 · 10 ⁵	n.d	33,23 ± 1,35	38,67 ± 1,47

^x Límite establecido en 0,15 mg mL⁻¹ y 0,15 mM para CM-Chitin-RBV y 4-MU-β-(GlcNAc)_n respectivamente.

^y K_m expresada en mg · mL⁻¹ para CM-Chitin-RBV y en mM para 4-MU-β-(GlcNAc)_n; k_{cat} expresada en ΔA₅₅₀ min⁻¹ para CM-Chitin-RBV y en s⁻¹ para 4-MU-β-(GlcNAc)_n; k_{cat}/K_m expresada en ΔA₅₅₀ mL min⁻¹ · mg⁻¹ para CM-Chitin-RBV y en s⁻¹ mM⁻¹ para 4-MU-β-(GlcNAc)_n.

n.d. Actividad hidrolítica no detectada.

Tabla 17. Parámetros de la ecuación de Hill y de la cooperatividad cinética para las isoenzimas BChi33 y AChi48 frente a diferentes sustratos

Isoenzima	Parámetro	Sustrato		
		CM-Chitin-RBV	4-MU- β -(GlcNAc) ₂	4-MU- β -(GlcNAc) ₃
BChi33	h	$1,27 \pm 0,05$	$1,45 \pm 0,01$	$1,43 \pm 0,05$
	$^xK'$	$0,08 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$
	yI	$4,86 \pm 0,03 \cdot 10^{-4}$	$10,38 \pm 0,05$	$2,91 \pm 0,04$
	h_{ext}	$1,58 \pm 0,03$	$1,65 \pm 0,01$	$1,58 \pm 0,02$
AChi48	h	$1,18 \pm 0,05$	$1,23 \pm 0,06$	$1,16 \pm 0,05$
	K'	$0,14 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,01$
	I	$2,15 \pm 0,01 \cdot 10^{-4}$	$7,89 \pm 0,06$	$15,02 \pm 0,08$
	h_{ext}	$1,26 \pm 0,02$	$1,45 \pm 0,02$	$1,31 \pm 0,01$

^x Expresada en $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ para CM-Chitin-RBV y en mM para 4-MU- β -(GlcNAc)_n.

^y Expresada en $\text{s} \cdot (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})^2$ para CM-Chitin-RBV y en $\text{s} \cdot \text{M}^2$ para 4-MU- β -(GlcNAc)_n.

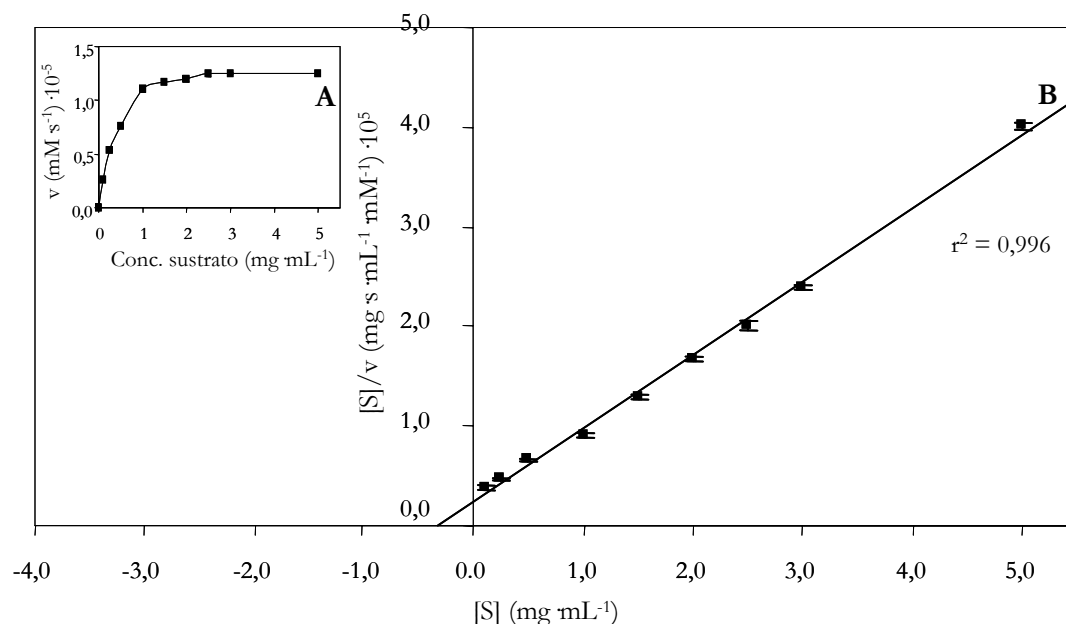


Figura 69. Análisis cinético frente a laminarina de la isoenzima AGlu19 purificada de mesocarpio de chirimoya (■). (A) Variación de la actividad enzimática con la concentración de sustrato. (B) Cálculo de K_m y V_{max} mediante la representación de Hanes-Wolf. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

Tabla 18. Propiedades cinéticas de las isoenzima AGlu19 purificada del mesocarpo de chirimoya

Parámetro ^x	AGlu19
K_m (mg · mL)	$0,32 \pm 0,03$
K_m (mM) ^y	$0,08 \pm 0,01$
k_{cat} (s ⁻¹)	$3,10 \pm 0,04$
k_{cat} / K_m (mL · mg ⁻¹ · s ⁻¹)	$9,57 \pm 0,47$
k_{cat} / K_m (s ⁻¹ · mM ⁻¹)	$38,27 \pm 1,90$

^x Determinados utilizando laminarina de *Laminaria digitata*.

^y Cálculos basados en una masa molecular de la laminarina de 4000 g · mol⁻¹.

8.2.- Determinación del mecanismo de hidrólisis

8.2.1.- Isoenzimas quitinasa

De acuerdo a los parámetros cinéticos obtenidos en el apartado anterior utilizando como sustrato los oligosacáridos sintéticos de N-acetilglucosamina, se determinó el mecanismo de hidrólisis de cada una de las isoenzimas quitinasa purificadas del mesocarpo de chirimoyas. Para la caracterización de estas enzimas, se estudió tanto la velocidad de producción de 4-MU frente a los diferentes sustratos como las constantes de afinidad por estos compuestos.

En el caso de la isoenzimas AChi48, AChi24, BChi33 y BChi14, esta enzimas produjeron 4-MU desde el disacárido 4-MU-β-(GlcNAc)₂ y el trisacárido 4-MU-β-(GlcNAc)₃, no observándose una reacción fluorescente utilizando el monosacárido 4-MU-β-GlcNAc (Tabla 16). A partir de la comparación de los valores de las k_{cat} de la hidrólisis de los diferentes compuestos fluorogénicos se puede concluir que las isoenzimas AChi24, BChi33 y BChi14 son fundamentalmente endoquitinasas. Esto se basa en el hecho de que la velocidad de generación de moléculas 4-MU sea significativamente superior para el trisacárido que para el disacárido, oscilando en un rango entre 2 y 4 veces mayor. Sin embargo, AChi48 presentó un panorama totalmente diferente, con una mayor velocidad de hidrólisis frente a 4-MU-β-(GlcNAc)₂. De hecho, esta isoenzima ácida produjo 4-MU más rápido (de 2 a 4 veces) a partir del disacárido sintético que para el trisacárido unido al grupo fluoróforo. *A priori* estos resultados indicarían que AChi48 tiende a reaccionar de forma preferente de acuerdo al exomecanismo de una quitobiosidasa. Sin embargo, su significativa capacidad de liberar moléculas de 4-MU a partir del trisacárido entraría aparentemente en contradicción con esta última deducción. Como se ha especificado anteriormente (Robbins *et al.*, 1988; Harman *et al.*, 1993; Sahai y Manocha, 1993), las quitobiosidasas catalizan la degradación de quitina de una manera escalonada liberando únicamente dímeros de diacetilquitobiosa, sin generar monosacáridos u oligosacáridos. De

acuerdo a esta definición, una enzima con este tipo de exomecanismo produciría dos productos que no emitirían fluorescencia a partir de 4-MU- β -(GlcNAc)₃: diacetilquitobiosa y un monosacárido asociado a 4-MU (4-MU- β -GlcNAc). No obstante, esta falta de absoluta especificidad en el mecanismo exo o endo también se observa en las tres isoenzimas definidas como endoquitinasas (AChi24, BChi33 y BChi14).

Como han descrito Robbins *et al.* (1988), el origen de esta ausencia de especificidad en la hidrólisis de los sustratos fluorogénicos se situaría en su misma naturaleza sintética, pudiendo el sustituyente no glucídico afectar positiva o negativamente sobre la velocidad de liberación de 4-MU. Esto podría conducir, por ejemplo, a una inesperada liberación de 4-MU desde el trisacárido sintético por una exoquitinasa o a la hidrólisis preferente del disacárido por una endoquitinasa. Por otro lado, el hecho de que el grupo 4-MU no sea un monómero de NAG puede implicar también efectos negativos. Por ejemplo, la escasa diferencia en las tasas de velocidad de hidrólisis entre 4-MU- β -(GlcNAc)₂ y 4-MU- β -(GlcNAc)₃ para la endoquitinasa BChi33 podría estar originada en una síntesis apreciable de 4-MU- β -GlcNAc a partir del trisacárido, reflejando su preferencia por la ruptura de enlaces GlcNAc-GlcNAc en oposición al enlace GlcNAc-4-MU (Tabla 19). En todo caso, el valor del ratio entre las constantes catalíticas de hidrólisis de sustratos con diferente grado de polimerización es generalmente suficiente para identificar el mecanismo de la enzima. En este sentido, un valor menor que 1 nos indicaría que nos encontramos ante una endoquitinasa y valores entre 1 y 10 reflejarían la presencia de un exomecanismo liberador de dímeros de diacetilquitobiosa. Así, y de acuerdo a los resultados experimentales que disponemos en este momento (Tabla 19), se puede concluir que el mecanismo de hidrólisis de AChi48 se aproximaría más al de una quitobiosidasa, aunque presente rasgos ligados a un endomecanismo, y que AChi24, BChi33 y BChi14 funcionan como endoquitinasas.

Por último, el mecanismo de hidrólisis encontrado para isoenzima AChi26 presentó grandes diferencias con las isoenzimas anteriores, al mostrar la capacidad de hidrolizar los tres compuestos asociados al grupo 4-MU. En este caso, tanto la velocidad de producción de 4-MU como la eficiencia catalítica de la reacción fue significativamente superior frente al monosacárido unido al grupo fluoróforo que cuando se utilizó el disacárido o el trisacárido (Tabla 16). La fuerte correlación entre los parámetros cinéticos de los diferentes sustratos y la longitud de cadena de éstos indicaría que esta isoenzima está hidrolizándolos siguiendo el mecanismo de una enzima 1,4- β -(N)-acetilhexosaminidasa, liberando monómeros desde el extremo no reductor. Asimismo, en la menor actividad específica de AChi26 frente a disacáridos y trisacáridos hay que tener en cuenta este mecanismo de hidrólisis. Si tomamos como ejemplo el sustrato 4MU- β -(GlcNAc)₃, tendríamos tanto una reacción con productos no fluorescentes [4MU- β -(GlcNAc)₂ + GlcNAc] como una con productos fluorescentes [4MU + (GlcNAc)₃]. A su vez, la hidrólisis del compuesto 4MU- β -(GlcNAc)₂ generado puede transcurrir de nuevo por estas dos vías. Puesto que sólo detectamos la presencia de 4-MU en solución, una parte de la actividad catalítica de AChi26 permanecerá enmascarada. En el caso del sustrato 4MU- β -GlcNAc no existe esta subestimación de la actividad, ya que su hidrólisis genera necesariamente fluorescencia.

Tabla 19. Ratios de las constantes catalíticas de las isoenzimas quitinasa purificadas del mesocarpo de chirimoya frente a los sustratos fluorogénicos 4-MU- β -(GlcNAc)₂ y 4-MU- β -(GlcNAc)₃

Isoenzima	$\frac{k_{cat} \text{ 4-MU-}\beta\text{-(GlcNAc)}_2}{k_{cat} \text{ 4-MU-}\beta\text{-(GlcNAc)}_3}$	Mecanismo de hidrólisis
AChi48 <i>Baja [Sustrato]</i> ^x	4,09 ± 1,33	Quitobiosidasa
AChi48 <i>Alta [Sustrato]</i>	2,27 ± 0,24	Quitobiosidasa
AChi24	0,26 ± 0,01	Endoquitinasa
BChi33 <i>Baja [Sustrato]</i>	0,61 ± 0,12	Endoquitinasa
BChi33 <i>Alta [Sustrato]</i>	0,57 ± 0,06	Endoquitinasa
BChi14	0,41 ± 0,02	Endoquitinasa

^x Limite establecido en 0,15 mM..

8.2.2.- Isoenzima 1,3- β -glucanasa

El modo de hidrólisis de la isoenzima AGlu19 fue determinado utilizando el compuesto sintético de laminarina oxidada con KIO₃, el cual sólo es degradado por las endo-1,3- β -glucanasas, y PNPG, que únicamente es hidrolizado por exo-1,3- β -glucanasas. La enzima purificada fue incubada siguiendo las directrices del apartado 12.2 del *Material y métodos* frente a los dos sustratos arriba mencionados y laminarina de *Laminaria digitata* como sustrato control. Así frente a una A.E obtenida con laminarina de $18,54 \pm 0,21 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, la reacción de hidrólisis de AGlu19 de la laminarina oxidada con periodato presentó unos valores de $18,17 \pm 0,19 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, alrededor de un 98 % de la actividad obtenida con el control. Por otro lado, esta enzima no degradó de manera significativa el PNPG, obteniendo una A.E casi residual ($0,04 \pm 0,02 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$), que representa únicamente un 0,2 % de la observada con laminarina. A la vista de estos resultados se puede concluir que la isoenzima AGlu19 degrada moléculas que contienen enlaces 1,3- β -glicosídicos mediante un mecanismo endohidrolítico. Apoyando esta apreciación, se encuentra la ausencia de inhibición por parte de δ -gluconolactona en todas las concentraciones utilizadas, presentando unos valores de actividad relativa que oscilaban entre un 97 y un 99 % (Tabla 20).

Tabla 20. Efecto de diferentes sustratos e inhibidores sobre la actividad enzimática de AGlu19

Compuesto	Actividad enzimática	
	A.E (U · mg ⁻¹)	Actividad relativa (%) ^x
Laminarina	18,54 ± 0,21 ^z	100
Laminarina oxidada	18,17 ± 0,19	98,0
PNPG ^y	0,04 ± 0,02	0,2
δ-gluconolactona		
0,5 mM	18,45 ± 0,37	99,5
2 mM	18,51 ± 0,09	99,8
10 mM	18,05 ± 0,43	97,4
30 mM	18,19 ± 0,11	98,1

^x Todos los compuestos fueron utilizados de acuerdo a lo especificado en el *Material y métodos*.

^y PNPG, *p*-nitrofenil-β-D-glucósido.

^z Cada valor proviene de la media de tres determinaciones diferentes de la actividad hidrolítica ± DE.

^a Los valores fueron normalizados con respecto a los obtenidos frente a laminarina.

8.3.- Estudio del efecto sinérgico entre isoenzimas quitinasa

En la bibliografía se observa como algunos tipos de glicosil hidrolasas de origen fúngico presentan diversos efectos sinérgicos en la degradación de ciertos polisacáridos (Fukamizo y Kramer, 1985a; Fukamizo y Kramer, 1985b; Schwarz *et al.* 1995). Así, y de acuerdo a estos trabajos, una hipótesis factible sería que una combinación de quitinasas con modos de acción diferentes podría actuar de una manera más efectiva y rápida en la degradación de constituyentes de la pared celular de patógenos que estas enzimas por solitario. En vista de las particularidades existentes en los mecanismos de hidrólisis de las isoenzimas quitinasa ácidas inducidas diferencialmente durante la conservación a bajas temperaturas (AChi24, AChi26 y AChi48), se optó por la determinación del efecto sinérgico entre ellas, cuantificando la hidrólisis de CM-Chitin-RBV con mezclas binarias de estas enzimas.

El sustrato CM-Chitin-RBV fue degradado durante 30 minutos por cada una de las isoenzimas AChi48, AChi26 y AChi24 en solitario y por dos mezclas entre isoenzimas (AChi26 + AChi48 y AChi26 + AChi24). Como puede observarse en las Figuras 70 y 71, la actividad hidrolítica de las mezclas entre isoenzimas es mayor que la actividad teórica correspondiente, procedente de la suma de las actividades de cada enzima actuando de forma individual. Estos resultados sugieren que AChi26 junto a AChi48 o AChi24 degradan el sustrato derivado de la

quitina de un modo sinérgico. En este sentido, el máximo coeficiente de sinergismo de la unión entre AChi26 con AChi48 fue de 1,42, y el de la mezcla de AChi26 con AChi24 de 1,63 (Tabla 21).

Por otro lado, y para determinar el mecanismo de estos efectos sinérgicos en la actividad quitinolítica se estudió el grado de sinergismo a lo largo del tiempo de reacción. En la Tabla 21 se muestra la disminución del coeficiente de sinergismo desde 1,35 a 1,11 para la mezcla de AChi26 + AChi48, y de 1,63 a 1,13 en el caso de AChi26 + AChi24. Estos descensos, proporcionales a la longitud del periodo de hidrólisis, indican que estos efectos sinérgicos surten más efecto en los pasos iniciales que en las etapas finales del proceso de degradación del sustrato.

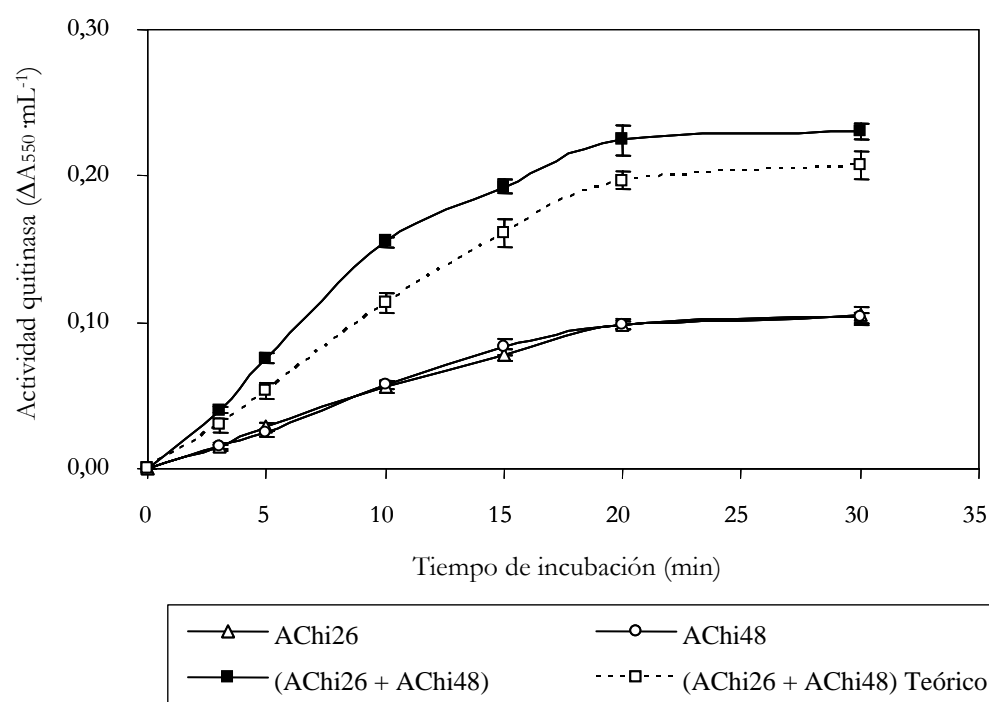


Figura 70. Efectos sinérgicos entre AChi26 y AChi48 en la hidrólisis de CM-Chitin-RBV. El sustrato fue incubado durante 30 minutos a 37 °C con 2 ng de cada una de las enzimas indicadas en la leyenda. La actividad teórica corresponde a la suma de las actividades de cada enzima actuando de forma individual. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

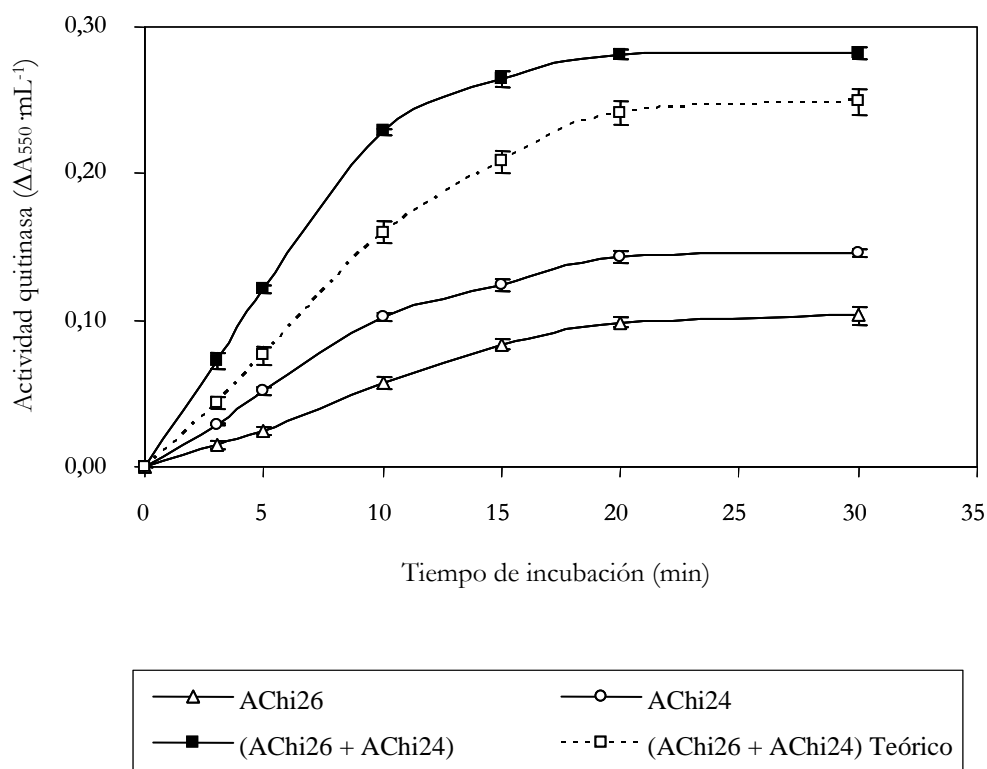


Figura 71. Efectos sinérgicos entre AChi26 y AChi24 en la hidrólisis de CM-Chitin-RBV. El sustrato fue incubado durante 30 minutos a 37 °C con 2 ng de cada una de las enzimas indicadas en la leyenda. La actividad teórica corresponde a la suma de las actividades de cada enzima actuando de forma individual. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

Tabla 21. Variación del coeficiente de sinergismo de las isoenzimas quitinasa ácidas con el tiempo de reacción

Mezcla ^x	Tiempo de reacción (min) ^y					
	3	5	10	15	20	30
AChi26 + AChi48	1,35 \pm 0,08	1,42 \pm 0,09	1,38 \pm 0,06	1,19 \pm 0,11	1,14 \pm 0,10	1,11 \pm 0,13
AChi26 + AChi24	1,63 \pm 0,04	1,60 \pm 0,05	1,43 \pm 0,08	1,27 \pm 0,07	1,16 \pm 0,09	1,13 \pm 0,08

^x La mezcla de reacción estuvo compuesta por 400 μ g de CM-Chitin-RBV, tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0, y 2 ng de cada una de las proteínas. La reacción se incubó en agitación durante 30 min a 37 °C.

^y El valor del coeficiente de sinergismo representa la relación entre la actividad hidrolítica de la mezcla entre la suma de las actividades de cada enzima actuando de forma individual.

^z Cada valor proviene de la media de tres determinaciones diferentes de la actividad hidrolítica \pm DE.

8.4.- Determinación de los parámetros termodinámicos de la reacción enzimática

Una vez medido el efecto de la temperatura de reacción en la actividad enzimática de las isoenzimas purificadas de mesocarpo de chirimoya (Fig. 47-49), se calculó la energía de activación de sus reacciones de hidrólisis frente a CM-Chitin-RBV y laminarina mediante la determinación de la pendiente de las representaciones de la ecuación de Arrhenius ($\log A.E$ en función de $1/T$). En estas gráficas se observó la presencia de un punto de inflexión en el aumento exponencial de la actividad específica con la temperatura (Fig. 72-74). Puesto que este perfil curvo puede afectar significativamente en la precisión de la medida de la E_a , únicamente se calculó la pendiente de la curva en un rango de temperaturas lineal (5-37 °C). Estas desviaciones de la dependencia exponencial con la temperatura son inherentes a la naturaleza proteica del catalizador, y más en concreto a su limitada termoestabilidad. Asimismo, se calcularon los valores de los tres parámetros termodinámicos de activación de la reacción de hidrólisis (ΔH^\ddagger , ΔG^\ddagger y ΔS^\ddagger) a 5 y 37 °C respectivamente (Tabla 22). El valor de la k_{cat} a 5 °C, necesario para la determinación de la ΔG^\ddagger , fue calculado transformando el valor correspondiente de la actividad específica en estas condiciones de reacción, tal y como se indica en el apartado 11.1.5 de la sección de *Material y métodos*.

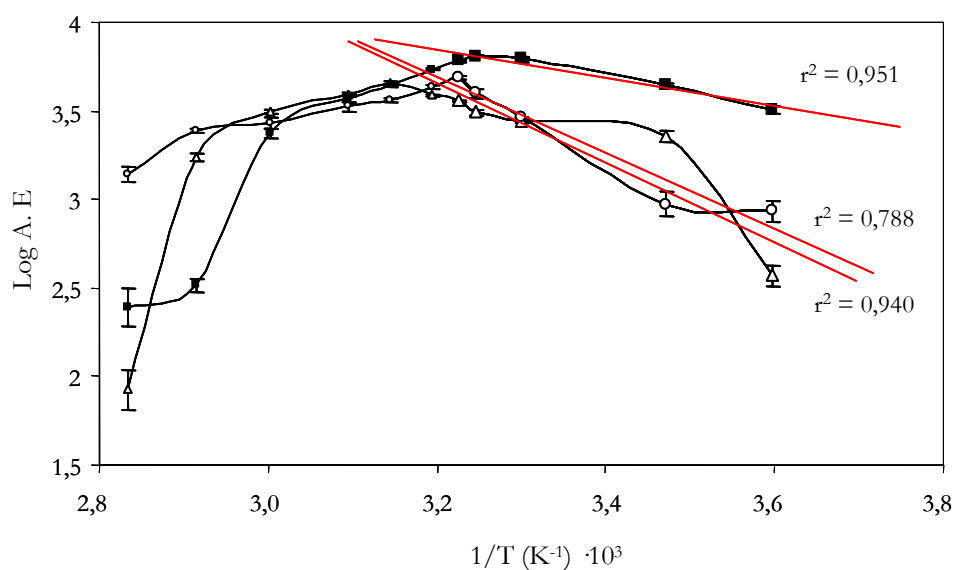


Figura 72. Representación de Arrhenius de las isoenzimas quitinasa purificadas del mesocarpo de chirimoya AChi48 (—■—), AChi26 (—○—) y AChi24 (—△—). La línea roja (—) corresponde a la regresión lineal de los datos experimentales. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

Disponer de los parámetros termodinámicos de una reacción catalizada por una enzima resulta de especial interés a la hora de analizar las relaciones entre reactividad y estructura. No obstante, es también importante tomar con cautela el significado real del valor absoluto de estos parámetros, ya que su determinación experimental asume un conjunto de simplificaciones bien conocidas (Fersht, 1985). Una de ellas es la existencia de un equilibrio entre el complejo ES en su estado basal y su estado activado (ES^\ddagger). En realidad, el estado en el que se encuentran los reactivos tiende a este equilibrio aunque nunca lo lleguen a alcanzar en el tiempo del ensayo. Por otro lado, aceptar la teoría del estado de transición como marco teórico para una reacción

enzimática implica una visión reduccionista de un fenómeno tan complejo al no tenerse en cuenta factores como la estructura tridimensional de la enzima, el mecanismo de catálisis, las interacciones con el solvente, etc. De todos modos, todos estos errores inherentes asociados a la metodología de cálculo seguida en este trabajo de investigación se ven atenuados si el análisis sólo considera la variación de los parámetros termodinámicos entre enzimas homólogas ante un sustrato similar y en iguales condiciones de reacción.

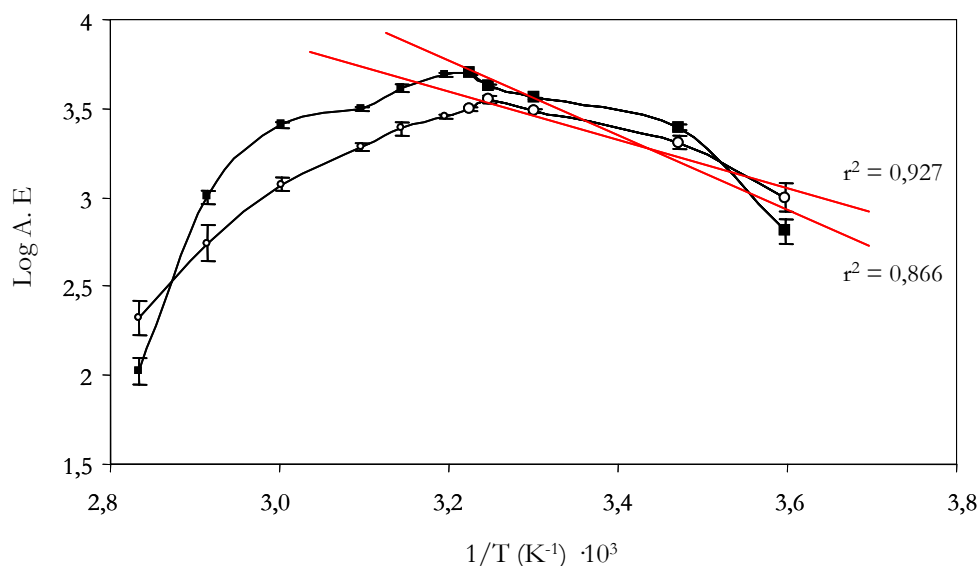


Figura 73. Representación de Arrhenius de las isoenzimas quitinasa purificada del mesocarpio de chirimoya BChi33 (—■—) y BChi14 (—○—). La línea roja (—) corresponde a la regresión lineal de los datos experimentales. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

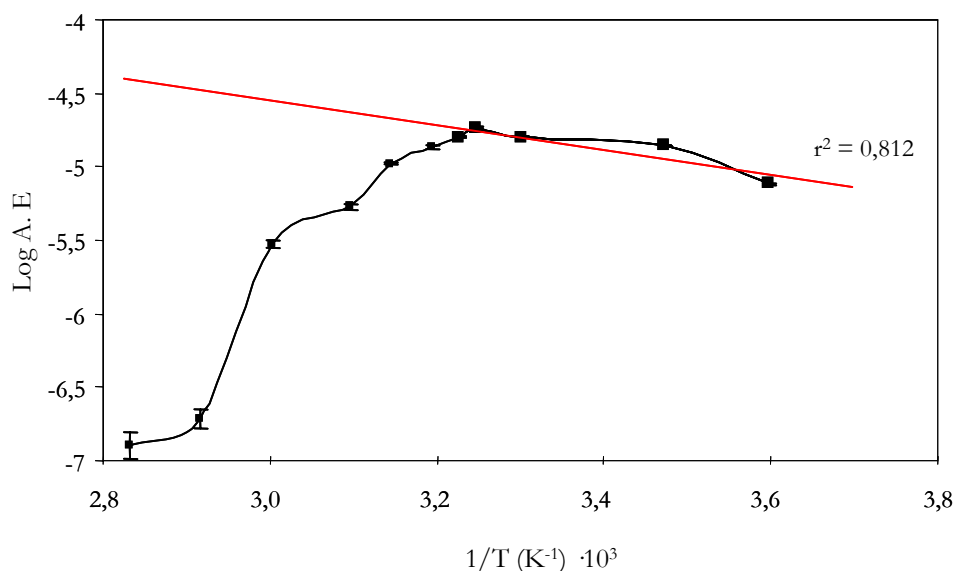


Figura 74. Representación de Arrhenius de la isoenzima AGlu19 purificada del mesocarpio de chirimoya (—■—). La línea roja (—) corresponde a la regresión lineal de los datos experimentales. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones \pm DE.

De acuerdo a los resultados observados en la Tabla 22 existen dos clases bien diferenciadas para las isoenzimas quitinasa purificadas: por un lado los parámetros termodinámicos de AChi48 y por otro los de AChi26, AChi24 y BChi33. La isoenzima BChi14

Tabla 22. Parámetros termodinámicos de activación de las isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa purificadas del mesocarpio de chirimoya

Isoenzima	T ^a (°C)	k _{cat} ^x	E _a (kJ mol ⁻¹)	ΔH [‡] (kJ mol ⁻¹)	ΔS [‡] (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG [‡] (kJ mol ⁻¹)
AChi48	5	0,64 ± 0,05 · 10 ⁵	6,56 ± 0,41	4,25 ± 1,24	-136,99 ± 5,06	42,33 ± 0,18
	37	1,29 ± 0,01 · 10 ⁵		3,98 ± 1,24	-134,55 ± 4,03	45,69 ± 0,02
AChi26	5	0,21 ± 0,03 · 10 ⁵	17,85 ± 1,29	15,54 ± 1,12	-105,84 ± 5,20	44,96 ± 0,34
	37	0,85 ± 0,05 · 10 ⁵		15,27 ± 1,12	-101,60 ± 4,07	46,77 ± 0,15
AChi24	5	0,09 ± 0,02 · 10 ⁵	18,71 ± 2,72	16,40 ± 1,55	-109,16 ± 7,28	46,74 ± 0,48
	37	0,79 ± 0,01 · 10 ⁵		16,13 ± 1,55	-99,43 ± 5,08	46,96 ± 0,03
BChi33	5	0,21 ± 0,04 · 10 ⁵	20,25 ± 2,04	17,94 ± 1,87	-96,65 ± 8,26	44,89 ± 0,43
	37	1,29 ± 0,01 · 10 ⁵		17,67 ± 1,87	-90,39 ± 6,07	45,69 ± 0,02
BChi14	5	0,15 ± 0,03 · 10 ⁵	11,32 ± 1,33	9,01 ± 1,46	-132,28 ± 6,93	45,78 ± 0,48
	37	0,22 ± 0,01 · 10 ⁵		8,74 ± 1,46	-133,90 ± 5,05	50,25 ± 0,12
AGlu19	5	2,45 ± 0,09	6,99 ± 0,62	4,68 ± 1,05	-220,04 ± 4,01	65,85 ± 0,08
	37	3,10 ± 0,04		4,41 ± 1,05	-221,59 ± 3,43	73,11 ± 0,03

^x Expresada en ΔA550 · min⁻¹ para las isoenzimas quitinasa y en s⁻¹ para AGlu19.

presenta propiedades intermedias entre ambos grupos, en función del parámetro termodinámico seleccionado, por lo que se analizará de forma separada más adelante. Uno de los aspectos más llamativos observados, una vez calculados los diferenciales entre ambas clases, es el valor sensiblemente inferior de la entalpía de activación para AChi48, el cual se ve reflejado en una $\Delta(\Delta H^\ddagger)$ que se mueven en un intervalo entre -11,29 y -13,69 kJ · mol⁻¹ (Tabla 22). Por otro lado, resulta significativo que la Δk_{cat} entre la isoenzima AChi48 y la mayor parte de isoenzimas quitinasa sea más elevada a bajas que a moderadas temperaturas, aunque no es algo sorprendente tras ver el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática (Fig. 47-49). En este sentido, si transformamos la ecuación utilizada para el cálculo de la k_{cat} de acuerdo a las premisas de la teoría del estado de transición, obtenemos un equivalente a la ley de Arrhenius que describe el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática:

$$k_{cat} = \frac{k_b \cdot T}{h} \cdot e^{-\Delta G^\ddagger / R \cdot T} = \frac{k_b \cdot T}{h} \cdot e^{-(\Delta H^\ddagger / R \cdot T - \Delta S^\ddagger / R)}$$

donde k_b es la constante de Boltzmann ($1,3805 \cdot 10^{-3} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$), h la constante de Planck ($6,6256 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$), ΔG^\ddagger la energía libre de activación, R es la constante molar de los gases perfectos ($8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$) y T es la temperatura expresada en K. En esta ecuación se puede observar como tanto la variación en la entalpía como en la entropía de activación pueden alterar el valor de la constante catalítica de la enzima. Obviamente, el término $\Delta H^\ddagger / R \cdot T$ tiene una mayor implicación en el descenso de la k_{cat} cuando la temperatura de reacción disminuye. De acuerdo a esta ecuación, la mayor aportación a la elevada velocidad de reacción de AChi48 a bajas temperaturas se debería al considerable descenso del valor de la ΔH^\ddagger , permitiendo en última instancia una reducción de la dependencia de su k_{cat} con la temperatura. En todo caso, el análisis de los parámetros termodinámicos de la formación del complejo activado enzima-sustrato (ES^\ddagger) demuestra claramente como los contrastes en la k_{cat} entre las diferentes isoenzimas son debidos en última instancia a la variación de la ΔG^\ddagger . Considerar únicamente la magnitud de la E_a (o ΔH^\ddagger) como una medida fiable de la menor o mayor eficiencia catalítica de la enzima, sin tener en consideración el factor entrópico de la reacción, se trató de un error frecuente en los primeros estudios en este campo (Low *et al.*, 1973) y que no permitía entender el mecanismo adoptado por las enzimas activas a las bajas temperaturas.

Por otro lado, y como resultado de esta menor ΔH^\ddagger para la isoenzima AChi48, el aumento esperable en la velocidad de reacción enzimática sería enorme con respecto al resto de isoenzimas quitinasa siempre que el valor de su ΔS^\ddagger se mantuviese constante. Pero la evolución de este parámetro entre las diferentes isoenzimas quitinasas refleja un persistente valor negativo para $\Delta(\Delta S^\ddagger)$ (Tabla 23). Esta circunstancia da lugar a un efecto de compensación entre el término entrópico y entálpico que se manifiesta consecuentemente en el parámetro $\Delta(\Delta G^\ddagger)$, encontrándose unas diferencias entre AChi48 y el resto de isoenzimas quitinasa relativamente pequeñas en términos de energía libre de activación.

Como se ha indicado previamente, la isoenzima BChi14 presenta un conjunto de características catalíticas y propiedades termodinámicas inusuales. Así, la menor cuantía de su entalpía de activación, con un valor intermedio entre las dos clases anteriores, resulta ampliamente superada por la magnitud de su entropía de activación, más cercana a la descrita para AChi48 (Tabla 22). Todo esto provoca en conjunto un elevado valor del parámetro $\Delta(\Delta G^\ddagger)$. Curiosamente, si comparamos este parámetro con el obtenido para el resto de isoenzimas, podemos constatar como éste es significativamente superior a moderadas temperaturas (Tabla 23)

Por último, en lo que respecta a la isoenzima AGlu19, la mera interpretación del valor absoluto de sus parámetros termodinámicos de activación resulta enormemente arriesgado tal y como se ha indicado anteriormente (Tabla 22). Por otro lado, aunque el valor de su E_a ($6,99 \pm 0,62 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) es muy similar al descrito para AChi48 ($E_a = 6,56 \pm 0,41 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) y también presenta una moderada actividad hidrolítica a bajas temperaturas (Fig. 49), tampoco sería correcto establecer una comparativa entre los parámetros de la isoenzima 1,3- β -glucanasa y esta isoenzima quitinasa (o el resto de isoenzimas purificadas). Aun compartiendo todas ellas el carácter de enzimas hidrolasas, los impedimentos se encuentran esencialmente en que ni el sustrato ni el mecanismo de catálisis son comunes. En todo caso, en la sección de *Discusión* se abordará una completa explicación de estos resultados para la isoenzima AGlu19 de acuerdo a los datos presentes en la bibliografía para otras enzimas 1,3- β -glucanasa.

Tabla 23. Variación de los parámetros termodinámicos de activación entre la isoenzima AChi48 y el resto de isoenzimas quitinasas purificadas del mesocarpio de chirimoya

Isoenzima	T ^a (°C)	Δk_{cat}^x	$\Delta(\Delta H^\ddagger)$ (kJ mol ⁻¹) ^y	$\Delta(\Delta S^\ddagger)$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	$\Delta(\Delta G^\ddagger)$ (kJ mol ⁻¹)
AChi48					
AChi26	5	$0,45 \pm 0,08 \cdot 10^5$	$-11,29 \pm 2,36$	$-31,15 \pm 10,26$	$-2,63 \pm 0,52$
	37	$0,44 \pm 0,06 \cdot 10^5$		$-32,95 \pm 8,10$	$-1,08 \pm 0,17$
AChi24	5	$0,55 \pm 0,07 \cdot 10^5$	$-12,15 \pm 1,96$	$-27,83 \pm 12,34$	$-4,41 \pm 0,66$
	37	$0,50 \pm 0,02 \cdot 10^5$		$-35,11 \pm 9,11$	$-1,27 \pm 0,05$
BChi33	5	$0,43 \pm 0,09 \cdot 10^5$	$-13,69 \pm 2,45$	$-40,04 \pm 13,32$	$-2,56 \pm 0,61$
	37	$0,00 \pm 0,02 \cdot 10^5$		$-44,16 \pm 10,10$	$0,00 \pm 0,04$
BChi14	5	$0,49 \pm 0,08 \cdot 10^5$	$-4,76 \pm 1,74$	$-4,71 \pm 1,73$	$-3,45 \pm 0,66$
	37	$1,07 \pm 0,02 \cdot 10^5$		$-0,65 \pm 1,02$	$-4,56 \pm 0,14$

^x Expresada en $\Delta A_{550} \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$.

^y De acuerdo a la definición de ΔH^\ddagger , la variación de este parámetro entre dos enzimas equivale a la diferencia entre sus E_a , siendo por tanto independiente de la temperatura a la que se produce la reacción enzimática

9.- Estudio de la funcionalidad de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa

9.1.- Actividad antifúngica *in vitro* frente a *Botrytis cinerea*

La capacidad de inhibición del crecimiento de las hifas del hongo *B. cinerea* fue determinada en placa PDA a 25 °C midiéndose tanto la actividad de las fracciones proteicas ácidas y básicas procedentes del mesocarpo de chirimoyas conservadas a bajas temperaturas y tratadas, o no, con altas concentraciones de CO₂, como la de las isoenzimas purificadas quitinasa y 1,3- β -glucanasa inducidas diferencialmente durante la conservación a bajas temperaturas.

El ensayo por difusión en un disco de papel estéril es una de las técnicas más aplicadas en las determinaciones de la actividad antifúngica por su sencillez y atractivo visual (Cole, 1994). Sin embargo, la propia naturaleza del análisis no lo hace adecuado para una correcta evaluación de los parámetros clásicos de inhibición del crecimiento fúngico. Así, la imposibilidad de cuantificar la cantidad de sustancia ensayada que ha difundido en el medio de agar utilizado, no permite un cálculo exacto de la CMI. En este sentido, Hadacek y Greger (2000) consideraron que aunque todas las metodologías de análisis son congruentes en la susceptibilidad de un hongo frente a una determinada sustancia, es inexacto establecer una comparativa entre los valores de CMI obtenidos. A la vista de estos antecedentes, y como se indica en *Material y métodos*, la medida directa en placa de Petri del diámetro de la zona de inhibición de crecimiento del micelio con respecto al disco control fue el parámetro elegido para cuantificar la actividad antifúngica de las proteínas.

9.1.1.- Fracciones proteicas ácidas y básicas

Se analizó la variación de la actividad antifúngica *in vitro* de las fracciones de proteínas ácidas y básicas procedentes del mesocarpo de chirimoyas recién recolectados y conservados durante 3 y 9 días a 6 °C, incluyendo aquellos tratados con altas concentraciones de CO₂ (Tabla 24, Fig. 75)

Uno de los resultados más destacables de este análisis es la nula inhibición del crecimiento del micelio, incluso a concentraciones tan elevadas como 10 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, por parte de los extractos proteicos de los frutos recién recolectados (Tabla 24). Este hecho sugiere que, al menos en las concentraciones presentes en estos extractos, las isoenzimas constitutivas quitinasa y 1,3- β -glucanasa del mesocarpo de chirimoyas no son efectivas en la inhibición del crecimiento de *B. cinerea*.

Por otro lado, la mayoría de los extractos procedentes de frutos conservados a bajas temperaturas no presentaron actividad antifúngica, sin diferencias significativas con los procedentes de frutos en el momento de la recolección (Tabla 24). Ese fue el caso de la fracción básica procedente de frutos conservados en aire durante 3 días a bajas temperaturas (Fig. 75D) o de las fracciones ácida y básica de chirimoyas tratadas y conservadas durante 3 días a 6 °C (Fig. 75G y H). A diferencia de estos extractos, sí que se pueden observar pequeñas zonas de inhibición tras la adición de 300 μg de proteínas provenientes de la fracción ácida de frutos no

tratados y conservados 9 días a 6 °C (Fig. 75E) o de la fracción básica de frutos tratados y conservados también durante 9 días a bajas temperaturas (Fig. 75J).

Tabla 24. Cuantificación de la inhibición del crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* por parte de fracciones proteicas ácidas y básicas procedentes del mesocarpio de chirimoya tratada y no tratada con altas concentraciones de CO₂ durante su conservación 6 °C o madurando a 20 °C

Temperatura (°C)	Día conservación	Distancia de inhibición fúngica (cm) ^x		
		Fracción ácida	Fracción básica	
6	0	0,02 ± 0,00 ^y aA	0,00 ± 0,00 aA	
	3	AIRE	1,14 ± 0,05 d ^z	0,01 ± 0,00 a
	9		0,44 ± 0,06 b	0,68 ± 0,02 c
	3	20 % CO ₂	0,02 ± 0,01 a	0,00 ± 0,00 a
	9		0,61 ± 0,06 c	0,25 ± 0,04 b
	20	1	AIRE	0,01 ± 0,00 A
2		0,79 ± 0,09 C		0,01 ± 0,01 A
3		0,63 ± 0,04 B		0,17 ± 0,03 B
4		0,05 ± 0,02 A		1,06 ± 0,07 D
3		20 % CO ₂	0,62 ± 0,08 B	0,58 ± 0,06 C

^x La distancia corresponde al radio estimado de la superficie de inhibición observada con respecto a la zona de crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* del disco control.

^y Cada valor proviene de la media de tres determinaciones diferentes de la actividad antifúngica *in vitro* ± DE con 300 µg de proteínas.

^z Los valores que mostraron diferente letra dentro de una columna son significativamente diferentes al nivel elegido (análisis univarianza ANOVA con test LSD y P≤0,05). Las letras minúsculas corresponden al análisis de las fracciones procedentes de frutos conservados a 6°C y las mayúsculas al de aquellas de frutos madurando a 20 °C.

En contraste con los resultados anteriores, se encontró la presencia de importantes zonas de inhibición al añadir a los discos de celulosa moderadas concentraciones (2 µg · µL⁻¹) de la fracción ácida de frutos no tratados y conservados durante 3 días a 6 °C (Fig. 75C). La existencia de esta significativa actividad antifúngica, entre 3 y 6 veces superior a la de los extractos arriba reseñados y máximo absoluto del ensayo (Tabla 24), pudo estar justificada, entre otros factores, por el fuerte aumento en la actividad quitinolítica en esta fracción (Fig. 19) y por la inducción diferencial de las isoenzimas AChi26 y AChi24 (Fig. 21). Al igual que ocurre durante los primeros días de conservación, la fracción básica de frutos conservados en aire durante mayores periodos de tiempo (9 días) mostró una elevada actividad antifúngica (Fig. 75F y Tabla 24). Asimismo, esta

última actividad antifúngica pudo estar condicionada tanto por el incremento coordinado de las actividades quitinasa y 1,3- β -glucanasa básicas de este extracto (Fig. 19 y 20) como por el incremento en la acumulación de BGlu76 y la inducción diferencial de la isoenzima quitinasa BChi33 (Fig. 25). Por otro lado, también se detectó una importante actividad antifúngica *in vitro* en la fracción ácida procedente de frutos tratados y conservados durante 9 días a 6 °C (Tabla 24). Al igual que en la fracción ácida de los frutos no tratados y conservados durante 3 días a 6 °C, este fenómeno pudo estar originado tanto por el aumento coordinado de las actividades quitinasa y 1,3- β -glucanasa (Fig. 19 y 20) como por la inducción diferencial de las isoenzimas AChi24, AChi26 y AGlu19 (Fig. 21).

Por otro lado, y de un modo equivalente al análisis de las actividades enzimáticas y los patrones de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa, también se procedió a la cuantificación de la actividad antifúngica frente a *B. cinerea* de los extractos ácidos y básicos procedentes de frutos madurando a 20 °C. En este sentido, las imágenes de la Figura 76 revelan claramente como la mayor actividad antifúngica de los frutos conservados en aire correspondía a los extractos ácidos de frutos en plena maduración (2-3 días 20 °C) y al extracto básico de frutos sobre-maduros (4 días 20 °C).

Durante el primer día de maduración no se observan cambios significativos en esta actividad respecto al estado inicial, como evidencian los valores de la fracción ácida y básica de los frutos (Tabla 24). Sin embargo, los valores de la fracción ácida muestran un fuerte aumento tras 2 días a 20 °C, con una leve disminución significativa posterior. A partir de este momento la actividad antifúngica ácida se desplomó, llegando a los niveles detectados en el estado inicial. Resulta esclarecedor recordar que es entre el segundo y tercer día de maduración cuando se detecta tanto la inducción diferencial de AChi26 y la acumulación de AChi27 (Fig. 23) como un acusado aumento en la actividad quitinasa y 1,3- β -glucanasa ácida (Tabla 6). De un modo similar al caso de los frutos conservados a 6 °C, parece evidente la relación entre estos cambios fisiológicos y la actividad inhibitoria en el crecimiento del micelio de *B. cinerea*. En contraste, puede apreciarse como la actividad antifúngica en la fracción básica evolucionó de forma diferente a la descrita para la fracción ácida. Esta actividad se mantuvo en niveles mínimos hasta el segundo día, para alcanzar a continuación valores bajos ($0,17 \pm 0,03$ cm) tras 3 días a 20 °C. El final del periodo de ensayo coincidió con el máximo de actividad antifúngica, triplicando el valor detectado 1 día antes (Tabla 24). Al analizar este aumento resulta obvia la semejanza con la fracción básica de los frutos no tratados tras 9 días a 6 °C. Al igual que en este caso, la inducción diferencial de BChi33 (Fig. 23), la acumulación de BGlu76 (Fig. 28) y el brusco incremento de la actividad 1,3- β -glucanasa básica (Tabla 6) pudo derivar en esta elevada actividad antifúngica.

Por otro lado, se puede observar un claro efecto estimulante del tratamiento con altas concentraciones de CO₂ sobre la actividad antifúngica global de los frutos a 20 °C (Fig. 76). Así, la actividad antifúngica se mostró en valores elevados y similares para ambas fracciones. Por otro lado, aunque no hubo grandes diferencias con la actividad antifúngica ácida de frutos no tratados de la misma edad cronológica, los valores obtenidos en la fracción básica fueron casi el doble que

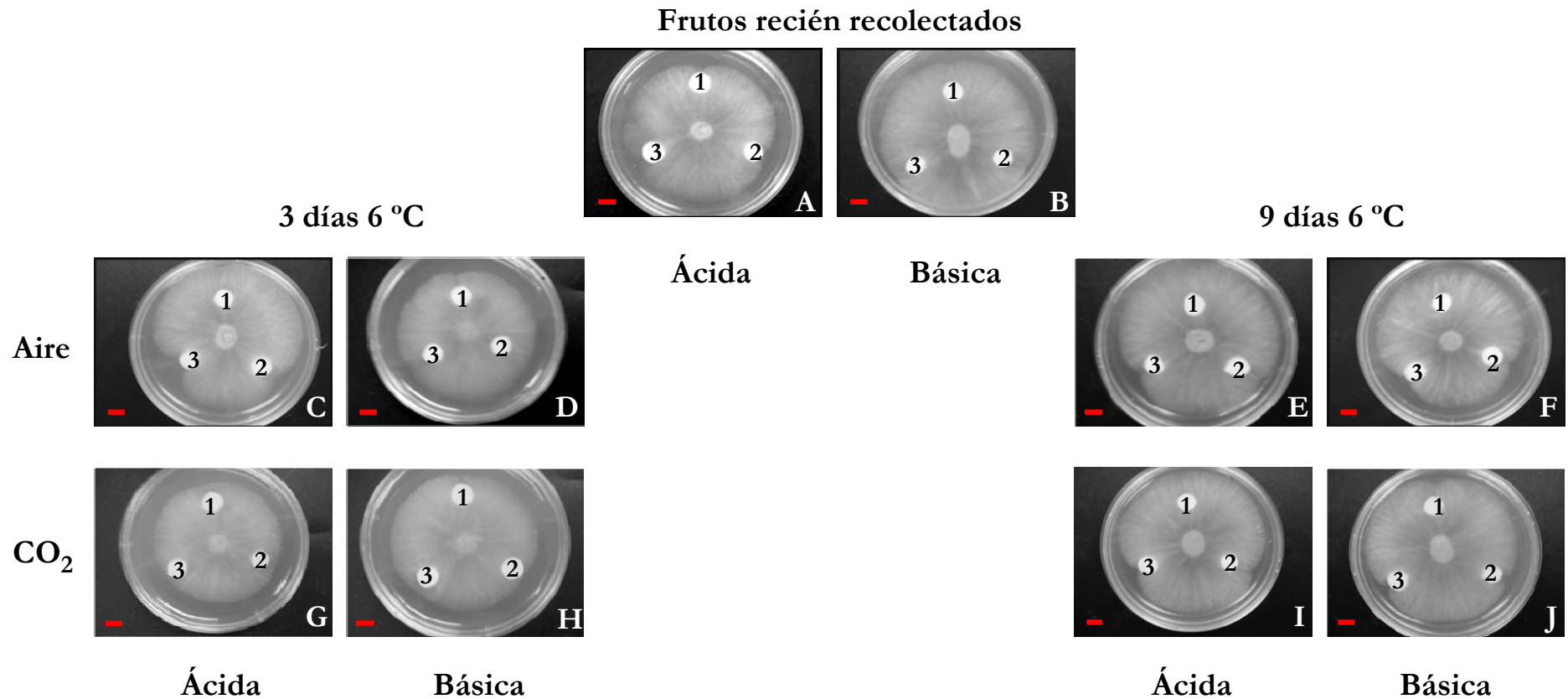


Figura 75. Ensayo de inhibición del crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* por parte de fracciones proteicas ácidas y básicas procedentes del mesocarpo de chirimoya tratada y no tratada con altas concentraciones de CO₂ durante su conservación a 6 °C. Fracciones ácidas de frutos recién recolectados (A), frutos conservados 3 y 9 días a 6°C (C y E), y frutos tratados conservados 3 y 9 días a 6°C (G e I). Fracciones básicas de frutos recién recolectados (B), frutos conservados 3 y 9 días a 6°C (D y F), y frutos tratados conservados 3 y 9 días a 6°C (H y J). *Disco 1*, Control, 30 µL de tampón acetato sódico 20 mM, pH 5,5; *Disco 2 y 3*, 60 y 300 µg de proteínas en 30 µL de tampón acetato sódico 20 mM, pH 5,5. La barra roja (—) equivale a 1 cm.

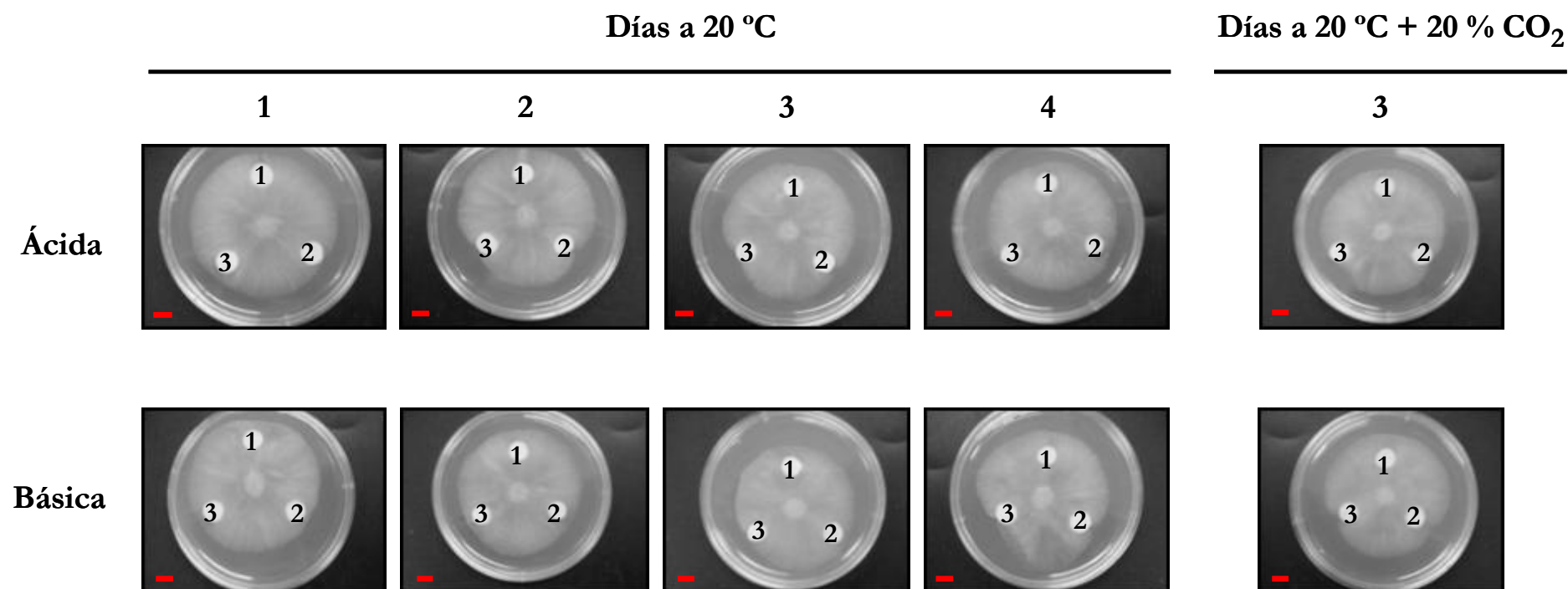


Figura 76. Ensayo de inhibición del crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* por parte de fracciones proteicas ácidas y básicas procedentes del mesocarpo de chirimoya tratada y no tratada con altas concentraciones de CO₂ durante su maduración a 20 °C. Las imágenes se disponen situando la fracción ácida en la parte superior y la básica en la inferior. Disco 1, Control, 30 µL de tampón acetato sódico 20 mM, pH 5,5; Disco 2 y 3, 60 y 300 µg de proteínas en 30 µL de tampón acetato sódico 20 mM, pH 5,5. La barra roja (—) equivale a 1 cm.

para los obtenidos en los frutos conservados en aire. En estos frutos tratados, el comportamiento de la actividad antifúngica parece vinculado a varios factores, muchos de ellos comunes con los frutos conservados en aire. Así, por ejemplo, el aumento de esta actividad en la fracción básica es concomitante al mantenimiento de los niveles de la actividad quitinasa y 1,3- β -glucanasa (Tabla 6). Sin embargo, en el caso de la fracción ácida, la exclusiva inducción de AGlu68 por efecto del tratamiento gaseoso parece tener una cierta influencia sobre su actividad antifúngica (Fig. 23).

Con el fin de corroborar estas últimas hipótesis, se ha estudiado tanto la actividad antifúngica frente a *B. cinerea* de las isoenzimas inducidas purificadas como el posible efecto sinérgico entre éstas y fracciones proteicas conteniendo isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa constitutivas en un estado de parcial purificación.

9.1.2.- Isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas

Para este ensayo, 10 y 40 μg (0,33 y 1,33 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ respectivamente) de las diferentes isoenzimas purificadas fueron colocadas sobre los discos de celulosa estériles, evaluando visualmente las zonas de inhibición presentes en la superficie de crecimiento del micelio de *B. cinerea*. En las concentraciones analizadas, sólo las isoenzimas BChi14 y AGlu19 no presentaron la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo, mostrando diferentes actividades antifúngicas el resto de isoenzimas (Fig. 77E y 77F). Basándonos en la medida del diámetro de la zona de inhibición de crecimiento de micelio se pudo establecer que la isoenzima AChi24 presentó los mayores niveles, especialmente a altas concentraciones de proteína (Fig. 77C y Tabla 25). Por otro lado, tanto la isoenzima AChi26 como BChi33 provocaron la aparición de zonas de inhibición en las placas de Petri, aunque éstas eran de una menor superficie que las encontradas para AChi24 (Fig. 77B y 77D). Un análisis más detallado de la isoenzima BChi33 nos permitió estimar que esta enzima básica mostró unos niveles bajos de actividad antifúngica cuando la concentración de proteínas fue de 0,33 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, incrementándose bruscamente con una concentración de 1,33 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, alcanzando los valores detectados para AChi26 (Tabla 25). Asimismo, la isoenzima quitinasa de mayor masa molecular, AChi48, exhibió una menor superficie de inhibición alrededor de los discos de celulosa, con unos valores entre un 40 y un 60 % menores que los descritos para el resto de enzimas quitinasa con actividad antifúngica. Por último, las isoenzimas BChi14 y AGlu19 no presentaron actividad antifúngica *in vitro* alguna en el rango de concentraciones ensayado (Fig 77F y Tabla 25).

9.1.3.- Efectos sinérgicos entre isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa

Dada la actividad antifúngica *in vitro* mostrada frente a *B. cinerea* por parte de algunas de las isoenzimas purificadas en este trabajo, se optó por la realización de un análisis similar para estimar si estas enzimas pueden actuar de forma sinérgica en la inhibición del crecimiento de las hifas de este hongo. Las mezclas se prepararon teniendo en cuenta tres factores: la actividad hidrolítica (Fig. 19 y 20) en los frutos en función del periodo y atmósfera de conservación a bajas temperaturas, la inducción coordinada de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa (Fig. 21 y 25) y las diferencias en los mecanismos de hidrólisis de las isoenzimas quitinasa ácidas.

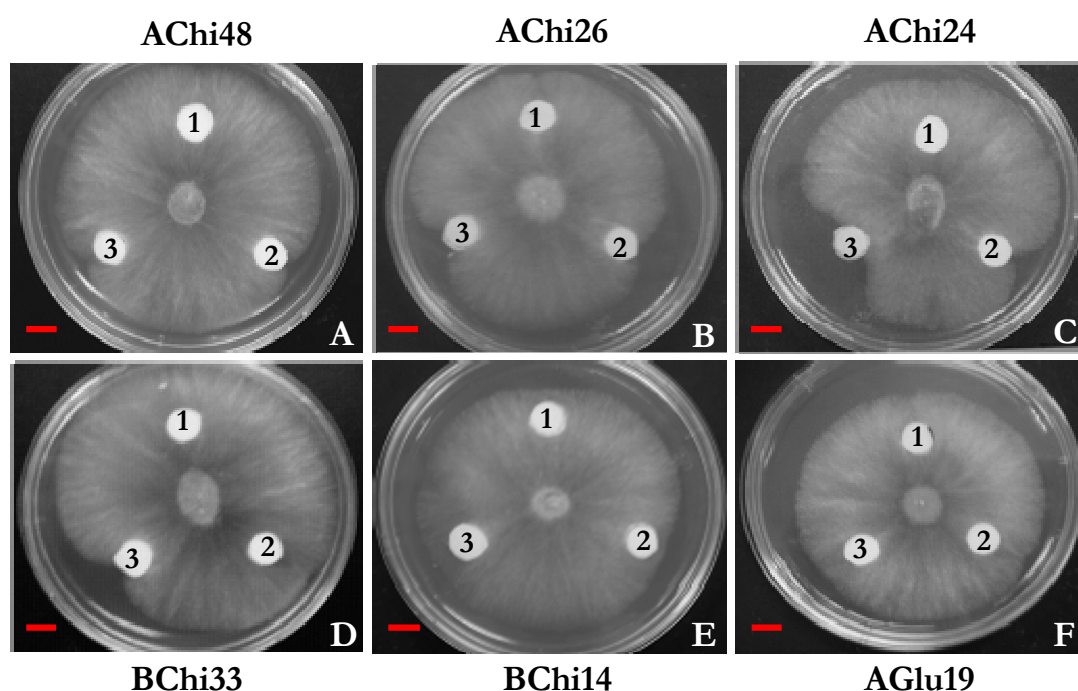


Figura 77. Ensayo de inhibición del crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* por parte de las isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa purificadas del mesocarpio de chirimoya. (A) AChi48; (B) AChi26; (C) AChi24; (D) BChi33; (E) BChi14; (F) AGlu19. Disco 1, Control, 30 μL de tampón acetato sódico 20 mM, pH 5,5; Disco 2 y 3, 10 y 40 μg de proteínas en 30 μL de tampón acetato sódico 20 mM, pH 5,5. La barra roja (—) equivale a 1 cm.

Tabla 25. Cuantificación de la inhibición del crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* por parte de las isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa purificadas del mesocarpio de chirimoya

Isoenzima	Distancia inhibición fúngica (cm) ^x	
	10 μg proteína	40 μg proteína
AChi48	0,46 ± 0,05 ^y	0,54 ± 0,03
AChi26	0,79 ± 0,06	0,95 ± 0,07
AChi24	0,79 ± 0,04	1,41 ± 0,11
BChi33	0,26 ± 0,02	0,87 ± 0,05
BChi14	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01
AGlu19	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00

^x La distancia corresponde al radio estimado de la superficie de inhibición observada con respecto a la zona de crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* del disco control.

^y Cada valor proviene de la media de tres determinaciones diferentes de la actividad antifúngica ± DE.

Por un lado, mezclas binarias entre la isoenzima AChi26 con las isoenzimas AChi48 y AChi24 respectivamente, fueron preparadas atendiendo a su inducción coordinada en frutos no tratados después de 3 días de conservación a 6 °C, caso de AChi26 y AChi24, o tras 5 días a 6 °C, para las isoenzimas AChi26 y AChi48 (Fig. 21). Otro criterio utilizado para seleccionar esta combinación de enzimas fue al efecto sinérgico observado en la actividad hidrolítica frente a CM-Chitin-RBV en el apartado 7.3 entre la isoenzima AChi26 con actividad 1,4- β -(N)-acetilhexosaminidasa y la endoquitinasa AChi24 o entre las dos únicas isoenzimas quitinasa con un exomecanismo de hidrólisis. La combinación de AChi26 y AChi48, añadiendo 5 μ g de proteína de cada isoenzima al disco, presentó una mayor efectividad en la inhibición del crecimiento fúngico que la suma promedio de las isoenzimas por solitario, con un factor de sinergismo de $1,52 \pm 0,13$. Cuadruplicando la concentración de estas isoenzimas, se obtuvo un valor de superficie de inhibición que prácticamente duplicó el estimado teóricamente (Fig. 78A y Tabla 26). La mezcla de 5 μ g de AChi26 y AChi24 provocó un efecto similar al descrito para la anterior combinación, evidenciando una mayor actividad antifúngica que el sumatorio calculado para las isoenzimas actuando individualmente. El ensayo con 40 μ g de proteínas totales confirmó la actividad sinérgica desarrollada entre ambas quitinasas, con una inhibición del crecimiento del micelio mayor (en torno al 35 %) que la suma de las actividades antifúngicas de AChi26 y AChi24 contempladas aisladamente (Fig. 78B y Tabla 26).

Para profundizar en el potencial antifúngico de las combinaciones entre diferentes tipos de glicosil hidrolasas del fruto, se realizaron varios análisis en los que se cuantificó la inhibición del crecimiento de las hifas de *B. cinerea* por parte de isoenzimas quitinasas y 1,3- β -glucanasas en similares concentraciones. Por un lado, se preparó una mezcla entre la isoenzima AChi24 y un extracto enriquecido en las isoenzimas constitutivas 1,3- β -glucanasa ácidas que se acumulaban de forma coordinada en frutos tratados conservados 9 días a 6 °C (AGluC: AGlu75 y AGlu36) (Fig. 21 y 22). La muestra con las isoenzimas constitutivas fue obtenida durante la purificación de la isoenzima AGlu19, y estaba compuesta por el intervalo de fracciones 6-8 eluido con 0,072-0,08 M NaCl de la cromatografía de intercambio aniónico con columna Mono-Q HR 5/5 (Fig. 38). La A.E que presentó esta fracción fue $7,30 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, sin observar cantidades apreciables de actividad quitinolítica ($41,25 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$). El análisis por inmunoensayo estableció la ausencia de otras isoenzimas 1,3- β -glucanasa ácidas diferentes a las constitutivas (datos no mostrados). Las enzimas hidrolíticas de esta mezcla (AChi24 + AGluC) disminuyeron considerablemente el crecimiento del micelio del hongo en la placa de Petri, tanto a baja como a alta concentración de proteínas, alcanzando valores de superficie de inhibición superiores que los encontrados para las combinaciones entre isoenzimas quitinasa ácidas (Fig. 78C y Tabla 26).

Con objeto de conocer con más detalle las implicaciones fisiológicas de la fuerte inducción coordinada de la isoenzima quitinasa AChi24 y la isoenzima 1,3- β -glucanasa AGlu19 en chirimoyas pretratadas con 20 % de CO₂ y conservadas durante 9 días a 6 °C (Fig. 21), se realizó un ensayo de actividad antifúngica *in vitro* con una combinación de ambas enzimas. En la Figura 78D se muestra la acusada inhibición del crecimiento del micelio del hongo alrededor de los discos de celulosa impregnados en la mezcla enzimática. La medida de la superficie de

inhibición reflejó una intensa actuación sinérgica entre AChi24 y AGlu19, con unos resultados que alcanzaron niveles entre 2 y 3 veces superiores a los calculados teóricamente (Tabla 26). Por otro lado, se estudió el comportamiento *in vitro* frente a *B. cinerea* de la mezcla entre AGlu19 y un extracto enriquecido en tres isoenzimas constitutivas quitinasa ácidas (AChiC: AChi70, AChi40 y AChi27). En la Fig. 22 se puede observar como las intensidades de las bandas correspondientes a estas enzimas se acumulaban de forma concertada en los frutos tratados en el periodo de conservación que transcurre entre 5 y 9 días a 6 °C. La fracción que contenía estas isoenzimas quitinasa ácidas procedía de la etapa de cromatoenfoque que se desarrolló en un gradiente de pH 6-4 durante la purificación de AChi26, seleccionando el grupo de fracciones 21-24, con un valor de pH que oscilaba entre 4,91 y 4,51 unidades (Fig. 33). El extracto ácido presentó una actividad específica de 614,61 U mL⁻¹ · mg⁻¹, con reducidos niveles de actividad 1,3-β-glucanasa (0,08 U · mg⁻¹), no detectándose las isoenzimas AChi26 y AChi48 en el análisis por inmunoensayo (datos no mostrados). Al contrario de los otros extractos proteicos analizados, esta combinación (AGlu19 + AChiC) no afectó al normal crecimiento de las hifas de *B. cinerea*, incluso con la utilización de una alta concentración de proteínas (Fig. 78E, Tabla 26).

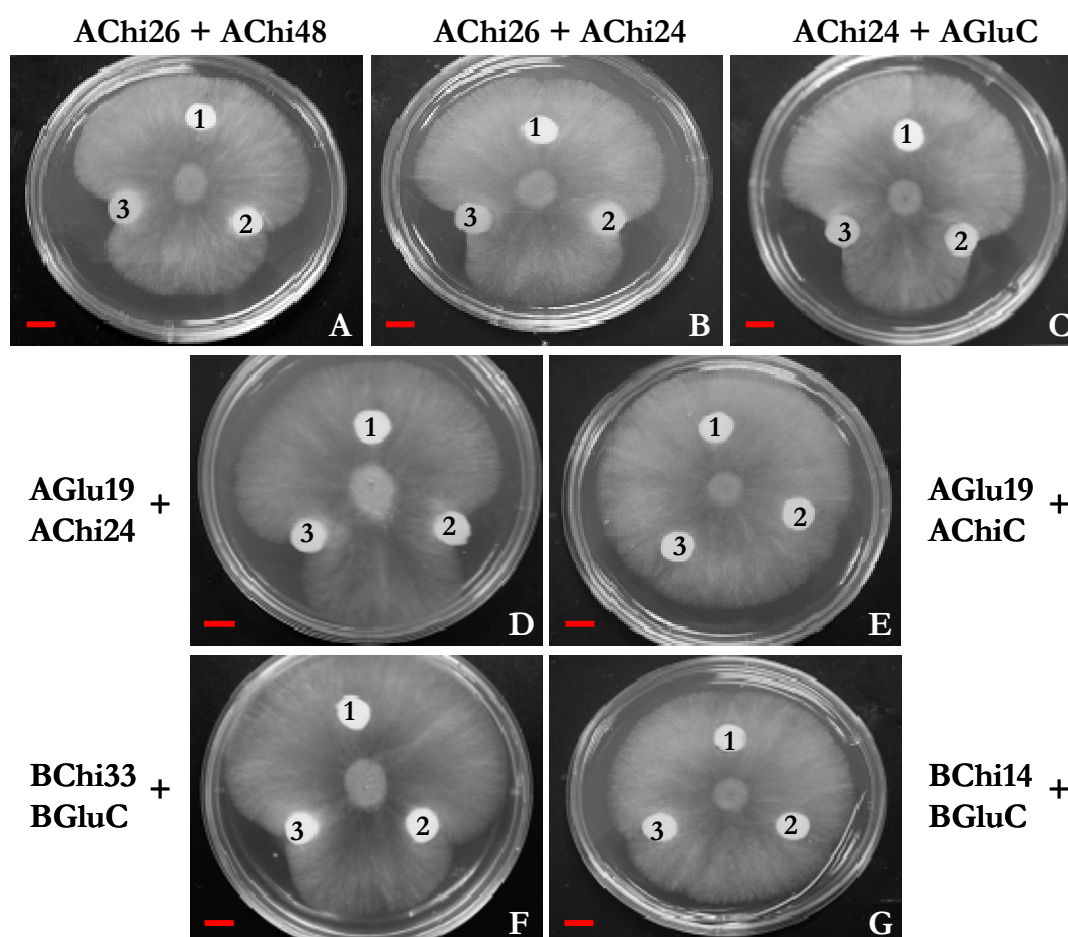


Figura 78. Ensayo de inhibición del crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* por parte de mezclas entre isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa purificadas del mesocarpio de chirimoya. (A) AChi26 + AChi48 (B) AChi26 + AChi24; (C) AChi24 + AGluC; (D) AGlu19 + AChi24; (E) AGlu19 + AChiC; (F) BChi33 + BGluC; (G) BChi14 + BGluC. *Disco 1*, Control, 30 μL de tampón acetato sódico 20 mM, pH 5,5; *Disco 2 y 3*, 10 y 40 μg de proteínas en 30 μL de tampón acetato sódico 20 mM, pH 5,5. La proporción de la mezcla fue de 1:1. La barra roja (—) equivale a 1 cm.

En los apartados 3.1 y 3.2 se ha constatado tanto un fuerte incremento coordinado de la actividad hidrolítica de las enzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa en la fracción básica de frutos no tratados y conservados 9 días a 6 °C (Fig. 19 y 20), como la concurrencia de un aumento en los niveles de algunas de las isoenzimas 1,3- β -glucanasa constitutivas básicas y la inducción diferencial de BChi33 (Fig. 25 y 26). Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió evaluar el potencial antifúngico frente a *B. cinerea* de la mezcla resultante entre la isoenzima BChi33 y un extracto que contenía mayoritariamente tres isoenzimas 1,3- β -glucanasa constitutivas básicas (BGluC: BGlu76, BGlu52 y BGlu43). Esta fracción fue obtenida en el transcurso de la purificación de BChi33, mediante la aplicación de un gradiente de pH 9-7, recogiendo para ello el rango de fracciones 16-23 que presentaban un intervalo de pH entre 8,19 y 7,59 unidades (Fig. 35). Su actividad específica frente a laminarina fue de 8,97 U · mg⁻¹, con trazas de actividad quitinolítica (1,14 U · mL mg⁻¹). La combinación de BChi33 y BGluC en una proporción 1:1 dio como resultado un significativo incremento de la actividad antifúngica sobre los valores alcanzados por la isoenzima BChi33 en solitario, indicando la presencia de una interacción sinérgica entre los dos tipos de hidrolásas básicas (Fig. 78F, Tabla 26). Este efecto sinérgico también fue detectado cuando se sustituyó la anterior isoenzima quitinasa por BChi14. Sin embargo la inhibición del crecimiento del micelio fue mucho menos acusada, siendo únicamente visible al utilizar la máxima concentración de proteínas, 1,33 μ g · μ L⁻¹, y en una magnitud que representó una cuarta parte de la descrita para la mezcla BChi33 + BGluC (Fig. 78G y Tabla 26).

Tabla 26. Cuantificación de la inhibición del crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* por parte de mezcla entre isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas del mesocarpio de chirimoya

Mezcla ^x	Distancia inhibición fúngica (cm) ^y		Coeficiente de sinergismo ^a	
	10 μ g proteína	40 μ g proteína	10 μ g proteína	40 μ g proteína
AChi26 + AChi48	0,95 \pm 0,08 ^z	1,42 \pm 0,09	1,52 \pm 0,13	1,91 \pm 0,07
AChi26 + AChi24	1,21 \pm 0,11	1,58 \pm 0,05	1,53 \pm 0,15	1,34 \pm 0,06
AChi24 + AGluC	1,37 \pm 0,07	1,85 \pm 0,12	n.d	n.d
AGlu19 + AChi24	1,18 \pm 0,06	1,68 \pm 0,08	2,88 \pm 0,14	2,35 \pm 0,12
AGlu19 + AChiC	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	n.d	n.d
BChi33 + BGluC	1,21 \pm 0,09	1,78 \pm 0,13	n.d	n.d
BChi14 + BGluC	0 \pm 0,00	0,46 \pm 0,07	n.d	n.d

^x La mezcla fue preparada en una proporción 1:1.

^y La distancia corresponde al radio estimado de la superficie de inhibición observada con respecto a la zona de crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* del disco control.

^z Cada valor proviene de la media de tres determinaciones diferentes de la actividad antifúngica \pm DE.

^a El valor del coeficiente de sinergismo representa la relación entre la distancia de inhibición fúngica de la mezcla entre la suma de la mitad de la distancia de inhibición fúngica de cada enzima actuando en solitario. n.d. No determinado.

9.2.- Actividad crioprotectora *in vitro* frente a lactato deshidrogenasa (LDH)

Además de la información que se puede extraer de los experimentos cinéticos y de la evaluación de la capacidad antifúngica acerca de la implicación de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa inducidas diferencialmente en el sistema de respuesta de defensa de la chirimoya en su conservación a 6 °C, la determinación de la actividad crioprotectora *in vitro* permite corroborar o descartar la presencia de otra funcionalidad, no relacionada con su actividad hidrolítica, y que ha sido observada en otras proteínas PR inducidas en respuesta a las bajas temperaturas (Hincha *et al.*, 1997; Dave y Mitra, 1998; Newton y Duman, 2000; Ukaji *et al.*, 2004).

En este análisis se ha usado LDH procedente de músculo de conejo como sustrato modelo, puesto que esta enzima es extremadamente lábil a temperaturas menores de 0 °C y pierde la mayor parte de su actividad catalítica tras un solo ciclo de congelación-descongelación por un proceso de desnaturalización por frío (Lin y Thomashow, 1992). En este sentido, el protocolo utilizado en este ensayo en ausencia de compuestos crioprotectores implicó una pérdida cercana al 95 % de la actividad enzimática de LDH (Fig. 79 y 81), obteniendo una base adecuada para el análisis de la actividad crioprotectora de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa. Para ensayar la capacidad crioprotectora de las enzimas aisladas en este trabajo de investigación, se procedió a la cuantificación de la actividad LDH residual después de dos ciclos consecutivos de congelación-descongelación en presencia de concentraciones equivalentes de las fracciones ácidas y básicas, las isoenzimas purificadas, BSA y sacarosa, utilizando estos dos últimos compuestos como control positivo (Tamiya *et al.*, 1985) y negativo respectivamente.

9.2.1.- Fracciones proteicas ácidas y básicas

La Figura 79 reveló que la actividad crioprotectora de los extractos proteicos procedentes de frutos no tratados era semejante a la encontrada en las fracciones obtenidas de los frutos recién recolectados y menores que las observadas para la proteína BSA en todo el rango de concentraciones ensayado. Sin embargo, se registró un incremento significativo de la crioprotección de la enzima LDH al utilizar los extractos de chirimoyas pretratadas con altas concentraciones de CO₂ con respecto a los niveles detectados en frutos no tratados y recién recolectados (Fig. 79). Tanto las fracciones ácidas de frutos tratados y conservados 3 y 9 días a 6 °C como la fracción básica de frutos tratados y conservados 9 días a 6 °C exhibieron valores de actividad crioprotectora significativamente mayores que los niveles descritos para el control BSA para todas las concentraciones de proteínas ensayadas. En estos casos la actividad LDH residual fue entre 1,5 y 2 veces mayor que la detectada para el control positivo, observándose una proporcionalidad entre la capacidad crioprotectora del extracto y la concentración de proteína añadida (Fig. 79C y 79D).

De estos resultados se deduce que el mesocarpo de chirimoyas tratadas con 20 % de CO₂ acumula proteínas crioprotectoras durante su conservación a 6 °C. Así, se planteó la incógnita de la naturaleza de la proteína o proteínas que presentaban esta funcionalidad. Por un lado, se analizó la contribución de las dehidrininas en la actividad crioprotectora de los extractos (Close, 1996). El procedimiento utilizado implicó incubar las fracciones ácidas y básicas de frutos

tratados a 80 °C durante 10 min, eliminando las proteínas precipitadas por el calor mediante su centrifugación a 35.000 x g durante 30 min a 4 °C. Las proteínas solubles a las altas temperaturas, entre las que se encuentran las posibles dehidrinas gracias a su elevada hidrofiliidad, fueron precipitadas con un 85 % de saturación de sulfato de amonio y centrifugadas a 15000 x g durante 20 min a 4 °C. El precipitado fue recogido, redissuelto en tampón Tris-HCl 20mM, pH 7,5 y desalado por ultrafiltración (membrana YM10). Cuando se ensayó la capacidad crioprotectora *in vitro* de estos extractos, la actividad LDH residual obtenida fue, para todas las cantidades de proteínas analizadas, menor que la obtenida para el control BSA y similar a la de los frutos no tratados (resultados no mostrados).

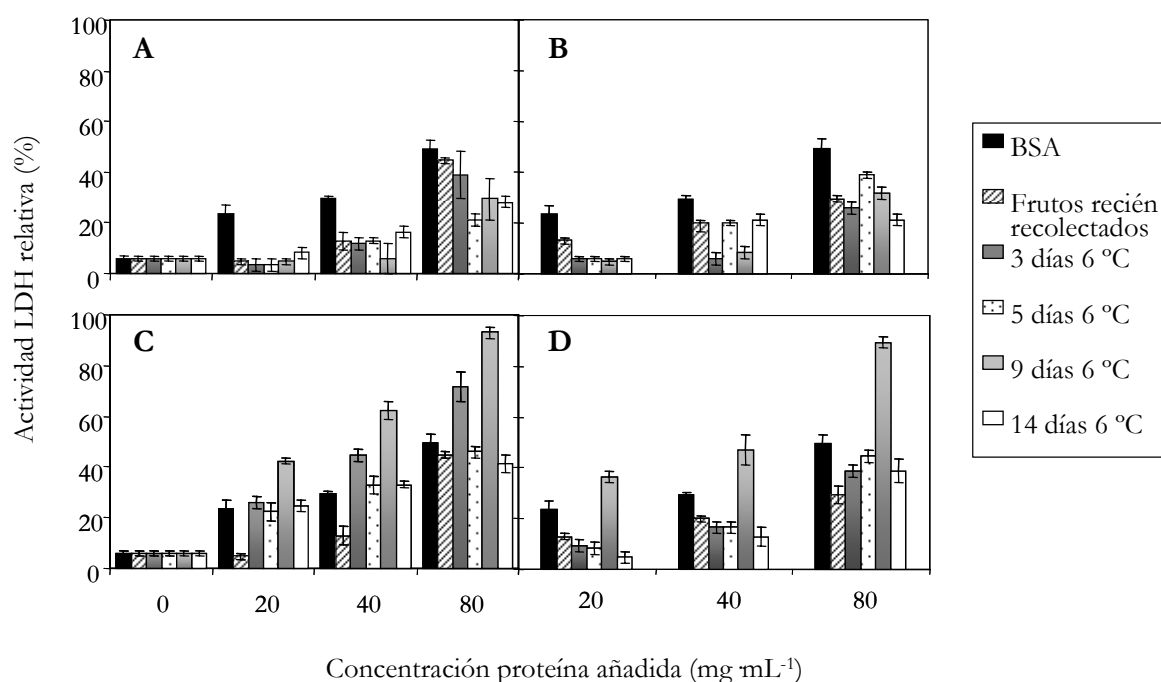


Figura 79. Actividad crioprotectora *in vitro* frente a LDH de las fracciones proteicas ácidas y básicas extraídas del mesocarpo de chirimoya durante su conservación a 6 °C, en aire y bajo el efecto del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂. (A) Fracción ácida en frutos no tratados; (B) Fracción básica en frutos no tratados; (C) Fracción ácida en frutos tratados; (D) Fracción básica en frutos tratados. La figura muestra el porcentaje residual de actividad LDH tras dos ciclos de congelación-descongelación en presencia de diferentes concentraciones de los extractos proteicos y BSA frente a un control no congelado. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones de 3 extracciones diferentes \pm DE.

Por otro lado, la concomitancia observada entre los altos valores de actividad crioprotectora y la inducción diferencial de las isoenzimas BChi14 y AGlu19, encontrándose incluso una fuerte correlación positiva entre esta actividad en la fracción ácida de los frutos tratados y la intensidad de la banda correspondiente a AGlu19 (Fig. 80; $r^2 = 0,939$, $P = 0,032$), nos llevó a determinar el potencial crioprotector de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa en el mesocarpo de chirimoyas conservadas a bajas temperaturas y en aquellas tratadas con altas concentraciones de CO₂.

9.2.2.- Isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas

La Figura 81 muestra como las isoenzimas AChi48, AChi26, AChi24 y BChi33 no ejercen una actividad crioprotectora sobre la enzima LDH tras dos ciclos de congelación-descongelación. La actividad residual de LDH mantuvo unos niveles sin diferencias significativas después de incubar esta enzima con estas isoenzimas quitinasa y los dos controles (BSA y sacarosa) en un rango de concentración entre 0,04 y 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Sin embargo, es a partir de esta concentración donde se puso de manifiesto la incapacidad de AChi48, AChi26, AChi24 y BChi33 en la protección de la enzima LDH sometida al proceso de congelación-descongelación. Mientras el control BSA aumentó de manera progresiva sus niveles de actividad crioprotectora, las isoenzimas quitinasa presentaron niveles situados en torno a un 25-60 % de los detectados para el control positivo. Así, tras la adición de 48 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (máxima concentración de proteína ensayada para estas isoenzimas) la actividad LDH residual no superó para ninguna de estas isoenzimas el 15 %, frente a un 30 % del control BSA y un 5 % del control sacarosa (Fig. 81).

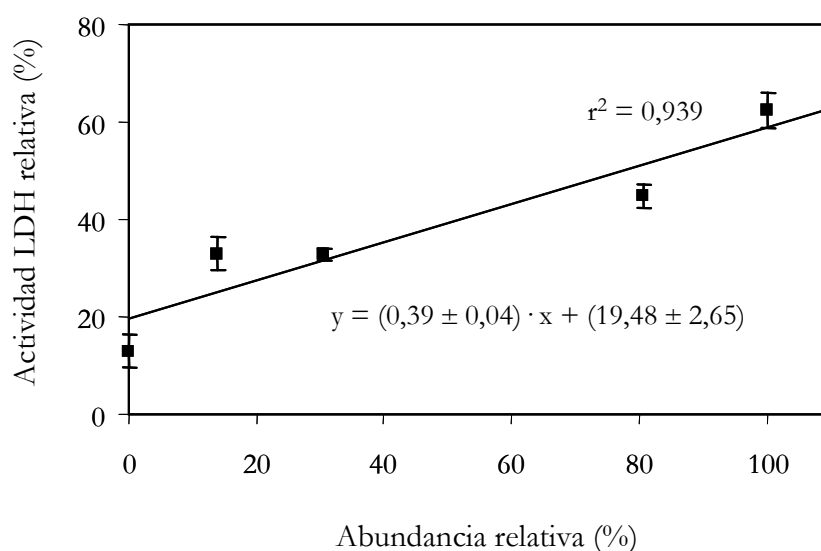


Figura 80. Correlación entre la intensidad de la banda de la isoenzima AGlu19 y la actividad crioprotectora *in vitro* frente a LDH de la fracción proteica ácida extraída del mesocarpo de chirimoya pretratada con altas concentraciones de CO_2 durante su conservación a 6 °C. Los valores de densidad óptica fueron normalizados (100 %) con respecto al máximo de cada serie. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones de 3 extracciones diferentes \pm DE.

Por el contrario, la utilización de AGlu19 y BChi14 incrementó de manera considerable la actividad crioprotectora, preservando, incluso a bajas concentraciones de proteína, una mayor actividad LDH residual que el control BSA (Fig. 82). La crioprotección de la enzima LDH se incrementó con la concentración de AGlu19 y BChi14, necesitando 8,7 y 6,4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de proteína, respectivamente, para mantener un 50 % de la actividad LDH, frente a una DP_{50} de 80,3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ en el caso del control BSA. En este sentido, se requirieron 48 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de ambas enzimas hidrolíticas para evitar cualquier pérdida de actividad LDH ($94,3 \pm 3,2$ y $108,9 \pm 5,6$ % de actividad LDH residual para AGlu19 y BChi14), frente a los 205 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de BSA necesarios para obtener unos niveles de actividad que se situaron en torno al 85 %. Resulta interesante resaltar como la isoenzima BChi14 presentó un valor de la actividad relativa para la enzima LDH

mayor del 100 % en la máxima concentración ensayada. La Figura 82 muestra también la baja actividad crioprotectora de la sacarosa comparada con las proteínas ensayadas. En este sentido, recordar que este disacárido se utiliza de modo habitual como crioprotector durante la congelación de membranas y tejidos en un intervalo de concentraciones muy por encima de las utilizadas en este experimento (Santarius y Bauer, 1983; Panis *et al.*, 2002).

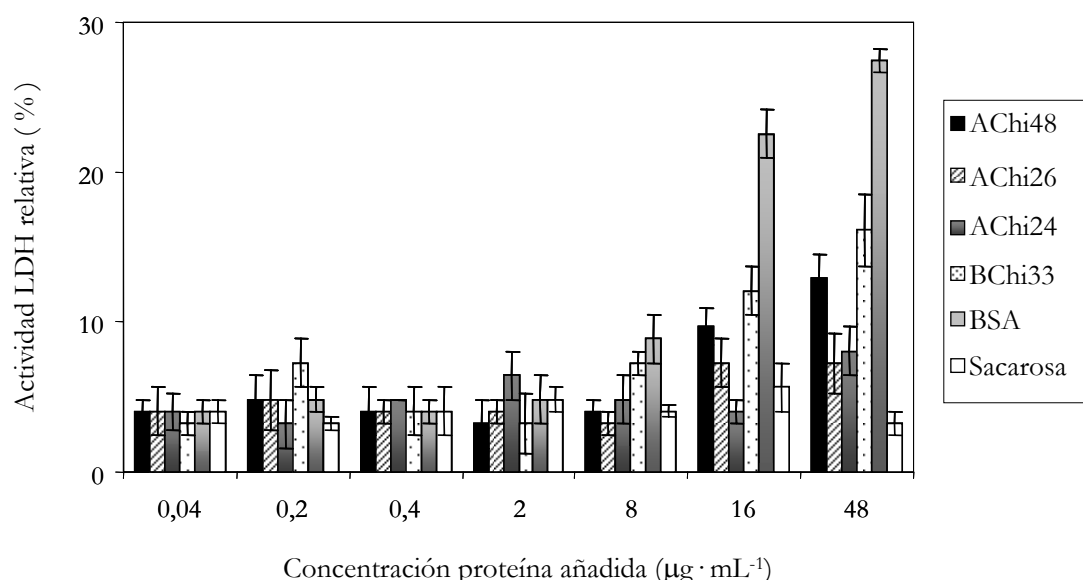


Figura 81. Actividad crioprotectora *in vitro* frente a LDH por parte de las isoenzimas quitinasa AChi48, AChi26, AChi24 y BChi33 purificadas del mesocarpio de chirimoya. La figura muestra el porcentaje residual de actividad LDH tras dos ciclos de congelación-descongelación en presencia de diferentes concentraciones de las isoenzimas, BSA y sucrosa frente a un control no congelado. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones de 3 extracciones diferentes \pm DE.

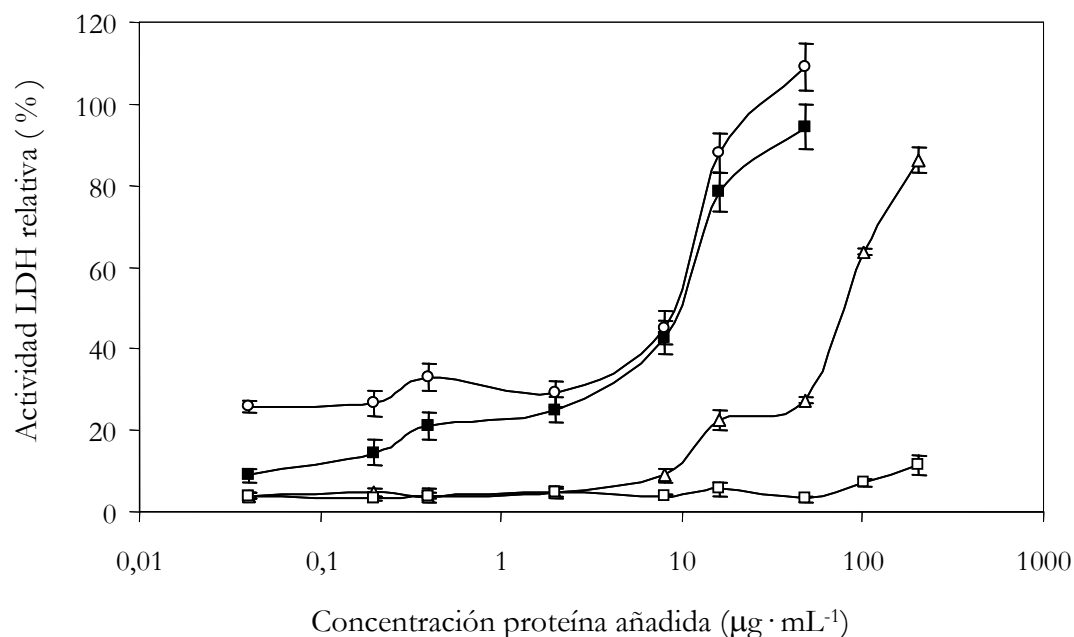


Figura 82. Actividad crioprotectora *in vitro* frente a LDH por parte de la isoenzimas BChi14 y AGlu19 purificadas del mesocarpio de chirimoya. La figura muestra el porcentaje residual de actividad LDH tras dos ciclos de congelación-descongelación en presencia de diferentes concentraciones de AGlu19 (—■—), BChi14 (—○—), BSA (—△—) y sacarosa (—□—) frente a un control no congelado. Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones de 3 extracciones diferentes \pm DE.

La DP_{50} de estas dos últimas enzimas fue utilizada como índice de capacidad crioprotectora, comparando su valor con el de otras proteínas de origen vegetal que han presentado estas mismas propiedades. Puesto que las proteínas presentaron valores heterogéneos de masa molecular, este parámetro fue expresado también en función de esta característica física, reflejando así el número de moléculas necesario para proteger a la enzima LDH (Tabla 27). De acuerdo a los resultados observados en esta tabla, AGlu19 y BChi14 presentaron una DP_{50} de 455 y 471 nM respectivamente, casi 3 veces más que la concentración obtenida para BSA. En este sentido, se calculó una escala normalizada de la actividad crioprotectora *in vitro* teniendo en cuenta los valores respectivos del DP_{50} del BSA y de las proteínas para facilitar el estudio comparativo entre ellas.

Tabla 27. Actividad crioprotectora *in vitro* frente a LDH por parte de proteínas inducidas en plantas y frutos por efecto de las bajas temperaturas.

Proteína	M_r (kDa)	DP_{50} ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) ^x	DP_{50} (nM)	$\frac{DP_{50}(\text{BSA})}{DP_{50}(\text{proteína})}$ y		Fuente bibliográfica
COR15a	15,0	0,1	7	280	57,1	Lin y Thomashow (1992)
P-80	58,5	2,8	48	35,7	31,6	Bravo <i>et al.</i> (2003)
DHN5	58,5	3,0	51	33,3	29,7	Bravo <i>et al.</i> (2003)
PCA60	60,0	20,0	333	5	4,5	Wisniewski <i>et al.</i> (1999)
COR85	85,0	15,0	176	3,1	3,9	Kazouka y Oeda (1994)
BChi14	14,5	6,4	441	12,5	2,8	Goñi <i>et al.</i> (2010)
AGlu19	19,2	8,7	455	9,2	2,7	Este trabajo de investigación
VcCHIT1b	41,0	3,0	96	4,7	2,2	Fernandez-Caballero <i>et al.</i> (2009)
CuCOR19	18,9	7,0	369	7,1	2,0	Hara <i>et al.</i> (2001)
AHCSP33	32,9	20,0	606	2,5	1,2	Dave y Mitra (1998)
27DHN	27,0	3,0	110	2,7	1,1	Momma <i>et al.</i> (2003)
WCS120	50,0	10,0	200	1,0	0,8	Houde <i>et al.</i> (1995)
26DHN	26,0	7,8	300	1,0	0,4	Momma <i>et al.</i> (2003)
BSA	66,0	80,3	1217	1,0	1,0	Goñi <i>et al.</i> (2010)

^x DP_{50} o dosis protectora al 50 %, es la concentración de proteína necesaria para mantener un 50 % de actividad LDH residual después de los ciclos de congelación-descongelación.

^y Ratio del DP_{50} entre el BSA y la proteína a estudio. En la columna de la derecha se expresa la relación másica y en la columna de la izquierda la relación molar. El valor correspondiente a la proteína BSA fue obtenido de los estudios citados en la tabla.

9.3.- Evaluación de la actividad de histéresis termal mediante DSC

La capacidad anticongelante de las AFP se fundamenta en dos características únicas derivadas de su interacción con los cristales de hielo. Por un lado, pueden adsorberse sobre los planos no basales de los cristales de hielo en una interfase hielo-agua (Raymond *et al.* 1989) y puede modificar su hábito de crecimiento para producir una morfología hexagonal (Griffith *et al.*, 1992; Griffith *et al.*, 1997). Por otro lado, este efecto, dependiente de la concentración de proteína, implica que las AFP hacen disminuir la temperatura de congelación o cristalización de la solución de un modo no coligativo, de tal manera que el descenso de la temperatura de congelación es mayor que el acontecido en la temperatura de fusión. Esta diferencia entre ambos parámetros termodinámicos se denomina THA y puede cuantificarse mediante DSC (DeVries *et al.*, 1986; Lu *et al.*, 2002).

En primer lugar, se estudiaron los termogramas de recrystalización de las muestras con la proteína BSA a una concentración de $3 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ y con una AFP de tipo III purificada del pez *Macrozoarces americanus* a 3 y $6 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (Fig. 83). Tal y como se observa en el termograma A de la Figura 83, la recrystalización de los núcleos de hielo del sistema agua-hielo mantenido a $0,1^\circ\text{C}$ del control BSA se produjo de manera inmediata una vez que la temperatura del sistema comenzó a descender. El pico exotérmico resultante apareció sin ningún tipo de retraso, indicando la incapacidad de esta proteína en modificar el hábito de crecimiento de los cristales de hielo. De este resultado se puede deducir que la proteína BSA no presenta ningún efecto de histéresis termal, conclusión similar a la que llegaron Wai-Ching *et al.* (1994) mediante criomicroscopía. En contraste con este comportamiento del control negativo, los termogramas correspondientes al sistema parcialmente fundido con el patrón AFP muestran un retraso en la aparición del pico de recrystalización, que se incrementó de $0,42$ a $0,58^\circ\text{C}$ al duplicar la concentración de proteína (Fig. 83, termogramas B y C, respectivamente). De este modo, la notoria diferencia entre los perfiles de las curvas de ambas proteínas control refleja de un modo gráfico el fenómeno de actividad de histéresis termal.

La mayoría de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas del mesocarpo de chirimoyas mostraron un comportamiento análogo al encontrado para el control BSA, sin ningún efecto de histéresis termal (Fig. 84 y 85). Sin embargo, el termograma correspondiente a la isoenzima AChi48 presentó un perfil intermedio entre la curva obtenida para la AFP de tipo III y el control BSA. En este caso, esta enzima mostró una lenta recrystalización del hielo de la mezcla una vez que la temperatura del medio comenzó a descender. Aunque la primera impresión a la que se llega es la presencia de un retraso en el pico de recrystalización de $0,15^\circ\text{C}$, el valor del flujo de calor aumentó de forma progresiva y no se mantuvo en niveles constantes como la AFP (Fig. 84, termograma C). No obstante, puesto que los resultados de este ensayo no condujeron a una elucidación clara de la posible funcionalidad anticongelante de AChi48, se procedió a analizar la THA de los dos controles utilizados y de esta isoenzima quitinasa disueltos en un tampón citrato sódico 100 mM en vez de agua ultrapura. Se ha demostrado que distintos compuestos de baja masa molecular incrementan de manera considerable la THA de las AFP, siendo el más

activo el anión citrato (Li *et al.*, 1998). La Figura 86 demuestra este efecto en la AFP utilizada como control, aumentando el valor de la T_H desde 0,42 a 0,95 °C. Aunque con el comportamiento térmico de la proteína BSA y la isoenzima AChi48 se puede especular con la existencia de un cierto efecto de histéresis térmica, especialmente en el caso de la isoenzima quitinasa, la interpretación más acorde con la realidad es que la mayor anchura del pico exotérmico de los dos termogramas (Fig. 84 y 86, termogramas C, respectivamente) es más bien debido a una disminución de la velocidad de recrystalización en condiciones de no-equilibrio que a la inhibición de la recrystalización del hielo (Knight *et al.*, 1988). Todos estos resultados indican que ninguna de las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas en este trabajo de investigación presentan la capacidad de alterar el normal crecimiento del cristal de hielo a las concentraciones ensayadas.

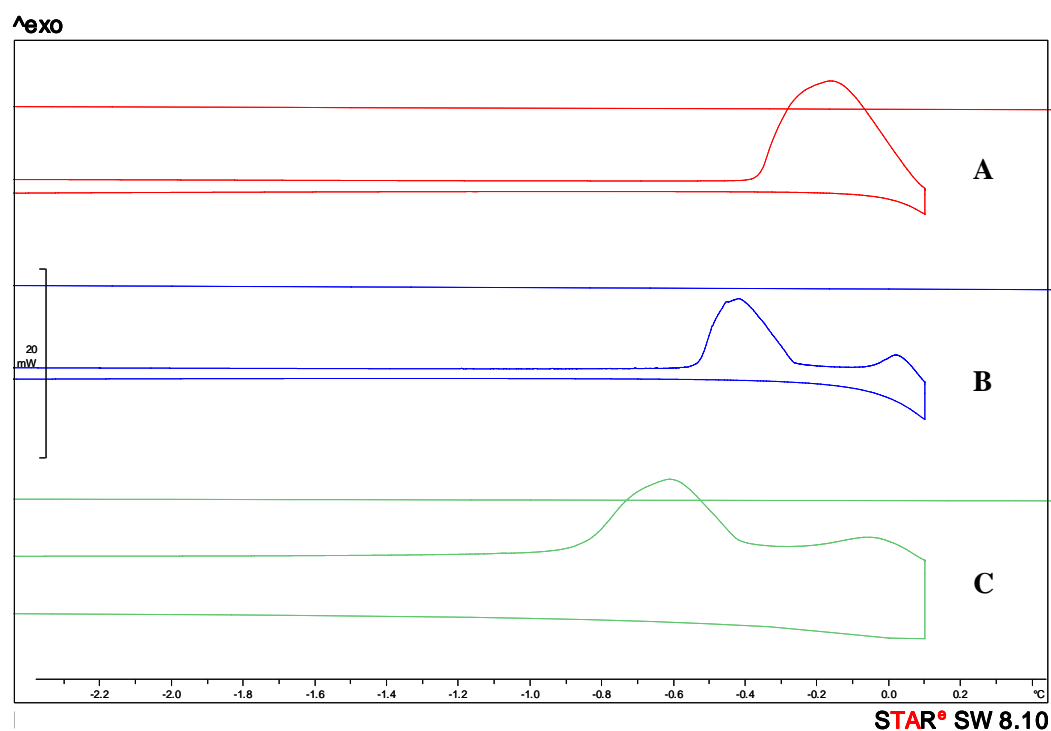


Figura 83. Termogramas de recrystalización de BSA y AFP de tipo III purificada del pez *M. americanus*. Se enfriaron ($-0,5\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$) muestras de las proteínas que se encontraban formando un sistema hielo-agua desde una T_p de $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$. (A —) $5,90\text{ }\mu\text{g BSA } 3\text{ }\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; (B —) $3,20\text{ }\mu\text{g AFP-III } 3\text{ }\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; (C —) $2,73\text{ }\mu\text{g AFP-III } 6\text{ }\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

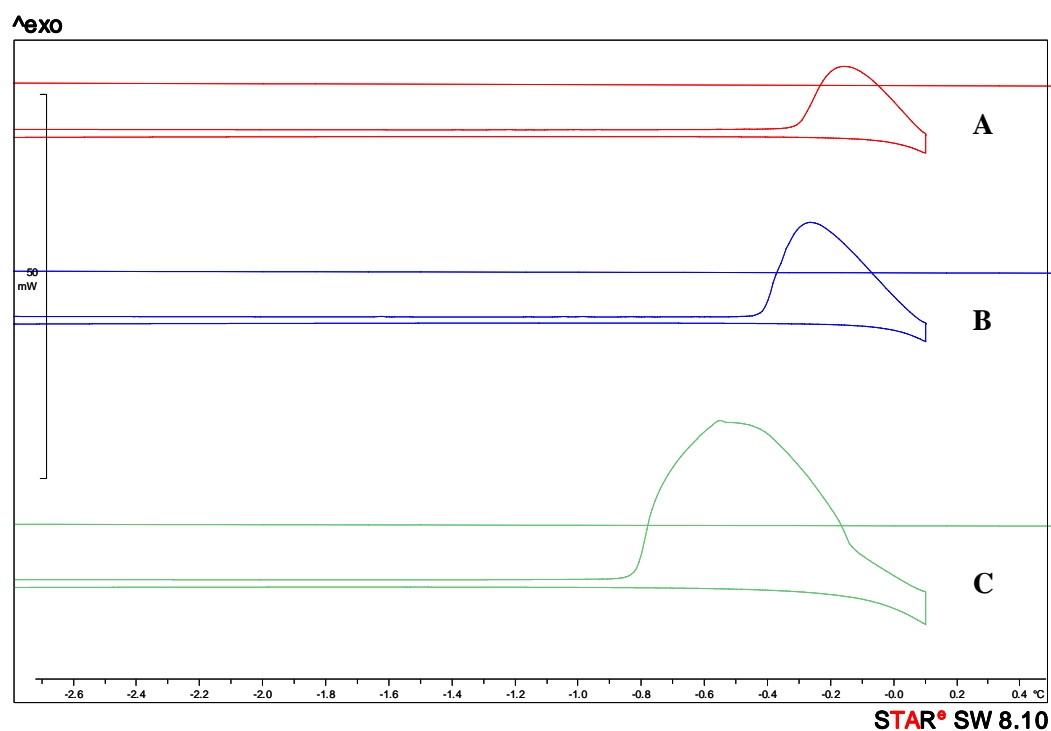


Figura 84. Termogramas de recrystalización de las isoenzimas quitinasa purificadas del mesocarpo de chirimoya AChi24, AChi26 y AChi48. Se enfriaron ($-0,5\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$) muestras de las proteínas que se encontraban formando un sistema hielo-agua desde una T_p de $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$. (A \rightarrow $2,64\text{ }\mu\text{g AChi24 } 3\text{ }\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; (B \rightarrow $3,94\text{ }\mu\text{g AChi26 } 3\text{ }\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; (C \rightarrow $4,51\text{ }\mu\text{g AChi48 } 3\text{ }\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

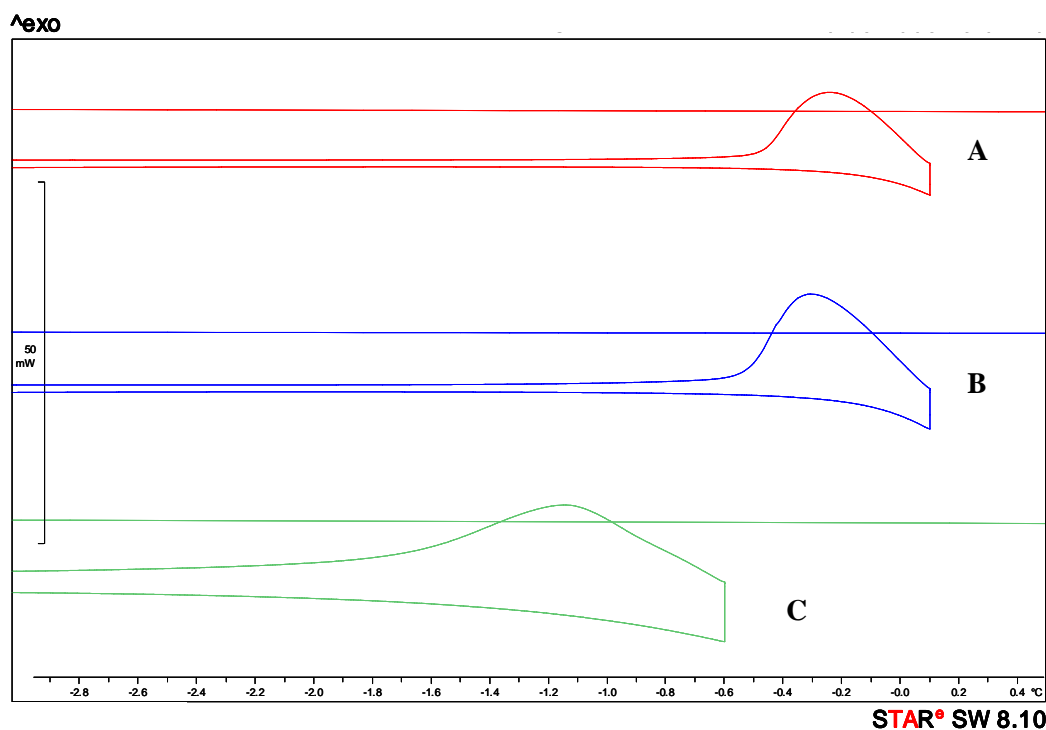


Figura 85. Termogramas de recrystalización de las isoenzimas purificadas del mesocarpo de chirimoya AGlu19, BChi14 y BChi33. Se enfriaron ($-0,5\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$) muestras de las proteínas que se encontraban formando un sistema hielo-agua desde una T_p de $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (A y B) y de $-0,6^{\circ}\text{C}$ (C). (A \rightarrow $3,50\text{ }\mu\text{g AGlu19 } 3\text{ }\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; (B \rightarrow $3,84\text{ }\mu\text{g BChi14 } 3\text{ }\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; (C \rightarrow $4,18\text{ }\mu\text{g BChi33 } 3\text{ }\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

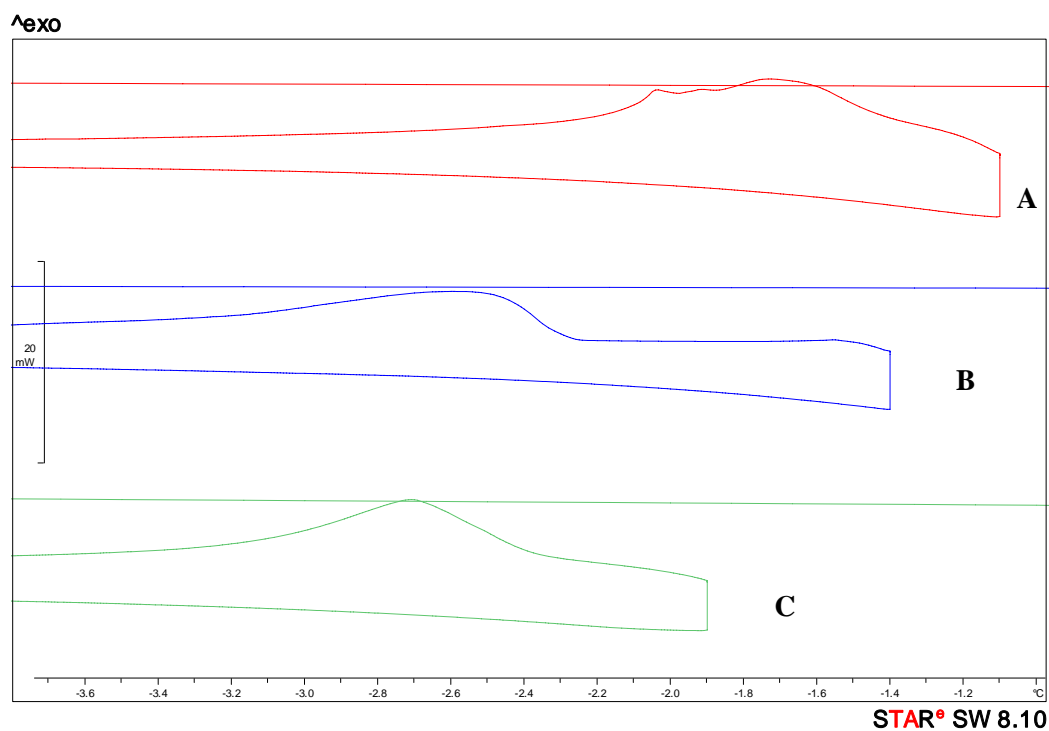


Figura 86. Termogramas de recrystalización de BSA, AFP de tipo III purificada del pez *M. americanus* y de la isoenzima AChI48 purificada del mesocarpio de chirimoya en presencia de tampón citrato sódico 100 mM. Se enfriaron ($-0,5\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$) muestras de las proteínas que se encontraban formando un sistema hielo-agua desde una T_p de $-1,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (A), $-1,4^{\circ}\text{C}$ (B) y de $-1,9^{\circ}\text{C}$ (C). (A—) $3,80\text{ }\mu\text{g BSA } 3\text{ }\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; (B —) $3,70\text{ }\mu\text{g AFP-III } 3\text{ }\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; (C —) $3,80\text{ }\mu\text{g AChI48 } 3\text{ }\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

DISCUSIÓN

1.- Estudio del patrón isoenzimático de quitinasas y 1,3- β -glucanasas en chirimoya y su relación con la actividad hidrolítica y antifúngica *in vitro*

La naturaleza estacionaria y estática de las plantas hace que éstas sean sumamente vulnerables al ataque de diferentes patógenos, estando asimismo expuestas a una amplia gama de estreses abióticos. Con el fin de protegerse de estas agresiones, las plantas han desarrollado a lo largo de la evolución una serie de estrategias exitosas. En este sentido, en los últimos años, se ha demostrado la existencia de un sistema inmune innato en las plantas al igual que en insectos y mamíferos (Jones y Dangl, 2006; de Wit, 2007). Una de sus principales características es su capacidad para desarrollar un conjunto de respuestas de defensa inducibles como consecuencia del reconocimiento específico de patógenos o de diferentes señales de estrés abiótico. Estas respuestas pueden ser activadas durante todo el ciclo vital y surgen del metabolismo secundario de la planta, incluyendo entre ellas el fortalecimiento de las defensas constitutivas (p.ej: la lignificación de la pared celular), la inducción del sistema antioxidante o la acumulación de fitoalexinas y proteínas PR. En este sentido, dentro de este último grupo de proteínas de defensa, tanto las quitinasas como las 1,3- β -glucanasas son las familias mejor estudiadas y caracterizadas (Schraudner *et al.*, 1992; Collinge *et al.*, 1993; Arie *et al.*, 2000; Leubner-Metzger y Meins, 1999; de los Reyes *et al.*, 2001; Kasprzewska, 2003; van Loon *et al.*, 2006).

Con el objeto de determinar en este fruto las características de su mecanismo de defensa activo, se estableció el patrón isoenzimático de las proteínas PR-2 y PR-3 mediante técnicas de inmunodetección con anticuerpos policlonales en muestras formadas por extractos parcialmente purificados en estas enzimas (Goñi *et al.*, 2009). Así, estos experimentos revelaron que el mesocarpo de chirimoyas recién recolectadas presentaba un complejo patrón para ambas enzimas de defensa (Fig. 21 y 25). En este tejido del fruto fueron identificadas 8 isoenzimas quitinasa expresadas constitutivamente, oscilando en un amplio rango de masa molecular (14,5-75,0 kDa) y distribuyéndose de un modo equitativo en función de su carácter ácido o básico. Aunque posteriormente a estos ensayos se estimó que la banda correspondiente a AChi40 era resultado de dos isoenzimas con una masa molecular y *pI* muy similar (Fig. 51), se optó por continuar con el criterio de definirla como una única proteína en la cuantificación de sus niveles. Esta decisión fue tomada tras comprobar como la falta de resolución en los geles de electroforesis utilizados no permitía separar y cuantificar correctamente las intensidad de señal de dos bandas tan cercanas entre si. Por otro lado, determinar la evolución de los niveles de AChi40a y AChi40b en las diferentes condiciones de conservación aplicadas al fruto requiere un trabajo adicional para el futuro que excede los objetivos iniciales propuestos en este trabajo de investigación. Con respecto a la enzima 1,3- β -glucanasa, el análisis mostró que los frutos recién traídos de campo presentaban 5 isoenzimas constitutivas en los tejidos del mesocarpo. Dos de ellas se pueden clasificar como ácidas y presentaron una masa molecular de 36,1 y 74,8 kDa. Las tres restantes exhibieron un carácter básico y una masa molecular que oscilaba entre 43 y 76 kDa. Aunque la mayoría de los valores de masa molecular de estas isoenzimas constitutivas se sitúan dentro del rango habitual (25-40 kDa) para las enzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa en plantas (Mauch *et al.*,

1988a; Hrmova y Fincher, 1993; Sahai y Manocha, 1993; Peumans *et al.*, 2000), no resulta insólito encontrar entre estas proteínas masas moleculares en un rango de 10-17,5 kDa (Kurosaki *et al.*, 1988; Kurosaki *et al.*, 1989; Lin *et al.*, 1992; Hou *et al.*, 1998; Lam *et al.*, 2001) o en valores que oscilen entre 50 y 80 kDa (Elghaouth *et al.*, 1991; Békésiová *et al.*, 2008). De un modo semejante al encontrado en otras plantas y frutos sanos, un gran porcentaje de la actividad quitinasa y 1,3- β -glucanasa fue detectada en la fracción básica o intracelular de los extractos proteicos (Cachinero *et al.*, 1996; McCollum *et al.*, 1997; Münch-Garthoff *et al.*, 1997). Por otro lado, aunque tradicionalmente se ha asociado la presencia de estas enzimas a respuestas de defensa, no es un fenómeno inusual la acumulación constitutiva de bajos niveles de quitinasas y glucanasas en frutos sin síntomas de ataque por patógenos (Derckel *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 1997; Masuda *et al.*, 2001; Taira *et al.*, 2005c; Deytieux *et al.*, 2007; Monteiro *et al.*, 2007; Negri *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2010).

Si bien ha sido descrita la existencia de un patrón complejo de quitinasas y 1,3- β -glucanasas constitutivas en algunos tejidos de frutos sanos (Alonso *et al.*, 1992; El Ouakfaoui y Asselin, 1992; McCollum *et al.*, 1997; Derckel *et al.*, 1998; Sarry *et al.*, 2004; Deytieux *et al.*, 2007; Giribaldi *et al.*, 2007), poco se conoce acerca de los cambios en la acumulación de estas proteínas y de su papel fisiológico a lo largo de diferentes etapas del desarrollo como la maduración o debido al efecto de tratamientos post-recolección. En este sentido, hay que tener en cuenta además que la etapa de maduración plena de la chirimoya se caracteriza por una considerable acumulación de azúcares solubles y un rápido ablandamiento. *A priori*, todo esto implicaría que este fruto podría ser un objetivo más susceptible al ataque de numerosos hongos fitopatógenos (Merodio y De la Plaza, 1997).

El estudio realizado durante la maduración de chirimoya a 20 °C reveló que en estos frutos se produce un marcado incremento de la actividad quitinasa y 1,3- β -glucanasa en las fracciones ácidas del mesocarpo. Este aumento estuvo asociado a la inducción diferencial de una nueva isoenzima (AChi26), al aumento significativo en la intensidad de la banda correspondiente a la isoenzima constitutiva AChi27, así como a la aparición y acumulación sistemática de la isoenzima AGlu51 a lo largo de la maduración (Tabla 6 y Fig. 23). Estos resultados muestran una cierta analogía con los obtenidos en unos estudios proteómicos de piel y pulpa de uvas a lo largo de su maduración. Así, los autores detectaron un acusado incremento de la actividad quitinasa y 1,3- β -glucanasa y de los niveles de estas enzimas entre la recogida y la madurez plena del fruto (Deytieux *et al.*, 2007; Giribaldi *et al.*, 2007). Este patrón de actividad hidrolítica y de isoenzimas relacionadas en la fracción ácida del mesocarpo transcurre en paralelo a los cambios de aquellos parámetros fisiológicos y bioquímicos característicos de la maduración plena de este fruto. Entre ellos se encuentran la aparición del primer pico respiratorio, el máximo de producción autocatalítica de etileno o un incremento en el contenido de sólidos solubles y de la acidez (Alique *et al.*, 1994; Escribano y Merodio, 1994; Goñi *et al.*, 2007). Aparte de su importancia en la maduración de frutos climatéricos, el etileno ha sido descrito como una hormona relacionada con situaciones de estrés y en numerosos sistemas vegetales se ha propuesto como señal inductora de quitinasas y 1,3- β -glucanasas (Boller *et al.*, 1983; Broglie *et al.*, 1986; Broglie *et al.*, 1989; Keefe *et*

al., 1990; Roby *et al.*, 1990; Hart *et al.*, 1993; Shinsi *et al.*, 1995). De acuerdo a la evaluación de los niveles de etileno en chirimoya durante su conservación a 6 y 20 °C (Muñoz *et al.*, 1999; Alique y Zamorano, 2000) y a los resultados obtenidos en el presente trabajo, el incremento en la producción de etileno durante la maduración podría estar implicado en la regulación de estas isoenzimas ácidas. Especialmente en el caso de la isoenzima AChi26, puesto que su expresión es coincidente con los mayores niveles de acumulación de etileno. Esta afirmación parece apoyada por la ausencia de AChi26 en la fracción ácida de los frutos pretratados con CO₂, ya que unos de los efectos asociados a este tratamiento gaseoso en frutos madurando a 20°C es la inhibición de la producción autocatalítica de etileno. Sin embargo, hay distintos resultados que apuntan en sentido contrario: a) La inducción de AChi26 y la acumulación de AChi27 también ocurre en frutos conservados durante 3 días a 6 °C (Fig. 21 y 22), condiciones en las cuales no se observa un incremento de la concentración de etileno basal por los bajos niveles de enzima ACC oxidasa (Muñoz *et al.*, 1999), b) un análisis detallado del patrón de inducción de AGlu51 y AChi27 durante la maduración de los frutos revela que estas isoenzimas se acumulan progresivamente hasta el final de este periodo, el cual está caracterizado por el inicio de un descenso de la concentración de etileno tisular, c) la inducción de AGlu51 también es significativa en la fracción ácida de frutos pretratados con CO₂. En este sentido, los resultados obtenidos con absorbedores de etileno en chirimoya sugieren que el papel de esta hormona está más relacionado con la coordinación y aceleración de los cambios asociados a su maduración que con su origen (Lahoz *et al.*, 1993; Merodio y De la Plaza, 1997; Li *et al.*, 2009). Por tanto, el estudio de los cambios en el patrón de isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa durante la maduración en chirimoya y la ausencia de tales modificaciones en frutos pretratados con altas concentraciones de CO₂ revelan que el patrón isoenzimático de estas enzimas hidrolíticas está relacionado con la maduración. Asimismo, es plausible afirmar que la señal (o señales) inductora de esta etapa del desarrollo en estos frutos también es la responsable de los cambios en los niveles de estas proteínas de defensa.

Por otro lado, el inicio de la maduración plena implicó también una moderada actividad antifúngica *in vitro* frente a *Botrytis cinerea* en los extractos ácidos parcialmente purificados (Tabla 24). Este suceso podría unirse tanto al acusado aumento de la actividad quitinasa y 1,3-β-glucanasa ensayada como a los cambios en el patrón de isoenzimas arriba mencionados. Aunque se encuentra ampliamente establecida la presencia de un amplio elenco de proteínas en diferentes tejidos vegetales capaces de inhibir el crecimiento de hongos, destacando las glicosidasas, tioninas, taumatinas o proteínas inactivantes del ribosoma, las quitinasas de plantas presentan un papel preponderante en los sistemas de defensa contra fitopatógenos debido a su amplio rango de actuación. Por otro lado, esta funcionalidad resulta potenciada frecuentemente al actuar las quitinasas de un modo sinérgico con enzimas 1,3-β-glucanasa en la digestión de los componentes de la pared celular de los hongos (Mauch *et al.*, 1988b; Ludwig y Boller, 1990; Arlorio *et al.*, 1992). Sin embargo, este hecho contrasta con la ausencia de inhibición del crecimiento del hongo por parte de los extractos ácidos de frutos situados en el mínimo preclimático (recién recolectados y 1 día a 20 °C). Los resultados parecen indicar que los niveles constitutivos de las isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa en estas etapas de la maduración no

son efectivos por si mismos frente a este hongo. De hecho, esta paradoja ha sido también observada en hojas de calabaza infectadas con *Colletotrichum lagenarium*, cuyos extractos con una alta actividad hidrolítica y enriquecidos con varias isoformas quitinasa y 1,3- β -glucanasa tampoco exhibieron actividad antifúngica *in vitro* (Ji y Kuć, 1996). En este sentido, es posible que sea necesaria una proporción específica de actividad quitinasa/1,3- β -glucanasa para el establecimiento de una significativa actividad antifúngica *in vitro* en estos complejos extractos proteicos.

El hecho de que la acumulación de algunas isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa se induzca tras iniciarse la maduración plena a 20 °C y que el fruto no muestre signos visibles de ataque por patógenos (Reginato y Lizana, 1980; Marín, 1997; Merodio y De la Plaza, 1997; Cotroneo y Besoaín, 1998; Pardo, 2001; Pentzke, 2006), parecen confirmar lo anticipado anteriormente acerca de que este fenómeno sea más un proceso asociado al propio desarrollo que una respuesta directa a factores externos o una infección. En este sentido, diferentes autores han observado también una inducción temprana del sistema de defensa en órganos específicos y flores, interpretándolo como una consecuencia de la presencia de un mecanismo profiláctico en tejidos de plantas muy susceptibles a la infección por patógenos bacterianos o fúngicos (Neale *et al.*, 1990; Hamel *et al.*, 1995; Buchter *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2002; Deytieux *et al.*, 2007; Negri *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2010). Asimismo, la acumulación simultánea de una quitinasa (PR-3), una osmotina (PR-5) y azúcares solubles durante la maduración de la uva ha sido correlacionado con el desarrollo de una resistencia a patógenos en el fruto (Salzman *et al.*, 1998). En este sentido, resulta interesante recalcar la inducción de un gran número de genes relacionados con la defensa por el efecto de altos niveles de azúcares solubles, encontrándose entre ellos el de un inhibidor de proteínasa II (Johnson y Ryan, 1990), el de una chalcona sintasa (Tsukaya *et al.*, 1991), el de una 1,3- β -glucanasa (Thibaud *et al.*, 2004) o los de algunas proteínas PR en tabaco (Badur *et al.*, 1994; Herbers *et al.*, 1995). En términos globales, estos datos sugieren que los azúcares juegan un papel activo no sólo como sustrato para satisfacer los requerimientos energéticos del fruto, sino también en la regulación de las respuestas de defensa (Roitsch, 1999). Asimismo, los resultados de este trabajo junto a las conclusiones de estos estudios indican que los cambios en la pared celular y la acumulación de glucosa y fructosa que siguen al inicio de la rápida maduración plena de la chirimoya podrían tener un importante rol en la consiguiente respuesta de defensa preventiva asociada a proteínas PR-2 y PR-3 ácidas. Este fenómeno coincide con algunas teorías que establecen una distribución no lineal de los sistemas de defensa a lo largo de la estructura de la planta. De este modo, resulta más probable que los tejidos más predispuestos al ataque de patógenos o con una mayor importancia cualitativa presenten un sistema de defensa optimizado (Stamp, 2003).

Debido a la rapidez de su proceso de maduración plena, la chirimoya 'Fino de Jete' alcanza un estado postclimatérico, preludio de la senescencia, en un periodo que oscila entre 4 y 6 días (Merodio y De la Plaza, 1997). Esta última etapa de la maduración se caracteriza por una acusada pérdida de la estructura celular, provocando que los tejidos sean más proclives al ataque de patógenos necrotróficos (Gutiérrez *et al.*, 1992). El estudio realizado en frutos tras 4 días de

maduración, indicó que la fracción básica parcialmente purificada poseía una elevada actividad antifúngica *in vitro* frente a *B. cinerea* (Tabla 24). Dada la coordinación entre la inducción de una nueva isoenzima quitinasa (BChi33), la marcada acumulación de BGlu76 (Fig. 24) y el incremento de la actividad 1,3- β -glucanasa básica, proponemos que esta inhibición del crecimiento del micelio del hongo esté fundamentada en un efecto sinérgico entre estos factores mencionados. En este sentido, se ha descrito un fenómeno similar en hojas de tabaco (Sela-Buurlage *et al.*, 1993), de tomate (Joosten *et al.*, 1995; Lawrence *et al.*, 1996) o de tallos de pimiento (Hwang *et al.*, 1997), asociando a las quitinasas y 1,3- β -glucanasa básicas un papel activo en la resistencia contra el ataque de hongos. Sin embargo, esta respuesta podría formar parte de la activación de una segunda etapa del mecanismo de defensa anticipado frente al ataque de patógenos una vez superada la fase de maduración plena. En este sentido, estudios realizados en hojas senescentes de tabaco han descrito la activación de los genes de una quitinasa y 1,3- β -glucanasa básicas sin observar signos de ataques por patógenos en estos tejidos, sugiriendo un aumento del potencial defensivo de la planta durante esta etapa final del desarrollo (Obregón *et al.*, 2001).

En suma, la expresión y actividad de las proteínas de defensa ácidas y básicas en chirimoyas revelaron que, al igual que ocurre en otras plantas (Stintzi *et al.*, 1993), en este fruto sólo aquellas isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa inducidas transitoriamente formarían parte de una potencial respuesta de defensa antifúngica eficaz. Si tenemos en cuenta la generalización que establece que las enzimas PR ácidas y básicas se ubican en el espacio extracelular y la vacuola respectivamente (van Loon, 1999), este mecanismo de defensa en el mesocarpo de chirimoya estaría ligado a su desarrollo (en este caso la maduración) y operaría en dos fases sucesivas: la activación inicial de un sistema de pre-defensa presumiblemente extracelular, seguido de una segunda etapa consistente en un activo mecanismo de defensa intracelular preventivo asociado con la pérdida de integridad celular y la degradación de la pared celular (Goñi *et al.*, 2010).

Los frutos subtropicales difieren de unas especies a otras en su susceptibilidad a desarrollar alteraciones fisiológicas durante su conservación post-recolección a bajas temperaturas. En este sentido, los frutos de chirimoya de la variedad 'Fino de Jete' son muy sensibles a desarrollar síntomas del daño por frío por la exposición a bajas temperaturas. Los resultados obtenidos en otro estudio de nuestro grupo estableció una temperatura límite de 8-10 °C y un tiempo de conservación umbral de 2-4 semanas para la aparición de este desorden fisiológico (Alique *et al.*, 1994). Por tanto, la conservación post-recolección a 6 °C de los frutos de esta variedad constituye un buen sistema de trabajo para estudiar las características asociadas a esta alteración, así como el efecto del pretratamiento gaseoso con altas concentraciones de CO₂, el cual ha sido tradicionalmente aplicado para aumentar la tolerancia del fruto a las bajas temperaturas. En este sentido, aunque ya han sido descritos muchos de los cambios fisiológicos y bioquímicos derivados de la conservación a moderadas y bajas temperaturas de la chirimoya (Alique *et al.*, 1994; Montero *et al.*, 1995; Escibano *et al.*, 1996; Escibano *et al.*, 1997; Merodio *et al.*, 1998; Maldonado *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2002b; Maldonado *et al.*, 2004), está aun por determinar la naturaleza de importantes elementos del sistema de respuestas de defensa inducibles.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación mostraron como la expresión de isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa ácidas y básicas en mesocarpo de chirimoya está fuertemente regulada por el tiempo de exposición a bajas temperaturas y las condiciones atmosféricas de conservación. Asimismo, estos mismos resultados reflejaron como estas variaciones descritas durante la conservación a 6 °C trazaban ciertas analogías con el comportamiento observado a lo largo de la maduración plena en aire. Así por ejemplo, como resultado de la exposición inicial a las bajas temperaturas se produjo un acusado aumento de la actividad quitinasa en la fracción ácida de los frutos no tratados (Fig. 19). Del mismo modo, este incremento también fue coincidente con la acumulación específica de AChi27 y la inducción de AChi26. Otra característica común se encontró en la práctica desaparición de cuatro isoenzimas quitinasa básicas constitutivas (BChi75, BChi56, BChi43 y BChi40) y en la menor acumulación de las dos isoenzimas constitutivas AGlu75 y AGlu36 (Fig. 21 y 25). Por otro lado, al igual que tras 4 días a 20 °C, un prolongado tiempo de conservación a 6 °C también provocó en la fracción básica de frutos no tratados la inducción de la isoenzima BChi33. Por tanto, parece que uno de los efectos de la conservación a 6 °C sobre la chirimoya implica el aplazamiento de algunos de los cambios asociados a las enzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa durante su maduración a 20 °C. Sin embargo, al analizar el efecto las bajas temperaturas resulta interesante señalar que estas condiciones introducen un nuevo factor de variabilidad. De este modo, el inicio de la conservación a bajas temperaturas se vio acompañado por la inducción diferencial y no coincidente de dos nuevas isoenzimas quitinasa ácidas, una de baja masa molecular tras 3 días a 6 °C (AChi24) y otra (AChi48) a partir del quinto día de conservación.

Los cambios bioquímicos de las enzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa que acompañan a la conservación a bajas temperaturas de las chirimoyas también se reflejaron en importantes diferencias de su potencial antifúngico frente a *B. cinerea* (Tabla 24). Así, la fracción ácida procedente de frutos conservados durante 3 días a 6 °C mostró una elevada actividad antifúngica *in vitro*. Aunque este comportamiento fue parejo con el descrito en esta misma fracción de los frutos en el inicio de la maduración a 20 °C, la magnitud de esta actividad fue casi el doble. Uno de los factores que pudo influir en esta diferencia se hallaría en la inducción específica de AChi24 y su posible efecto sinérgico con el resto de isoenzimas quitinasa de la fracción ácida. En este sentido, hay que tener en cuenta la interacción sinérgica entre diferentes quitinasas se trata de un rasgo característico de esta enzima (De la Cruz *et al.*, 1992; Lorito *et al.*, 1993; Inui *et al.*, 1996). Asimismo, detrás de la moderada actividad antifúngica de la fracción ácida de los frutos conservados 9 días a 6 °C pudo situarse la fuerte inducción de la isoenzima AChi48 junto a la marcada acumulación de la isoenzima AChi70. Por otra parte, 9 días de conservación a 6 °C también provocó la aparición de una actividad antifúngica en la fracción básica de chirimoyas conservadas en aire. Por tanto, aunque los resultados obtenidos ponen de manifiesto la presencia de una interrelación entre la inducción de BChi33, la actividad antifúngica frente a *B. cinerea* y los prolongados tiempos de conservación a 6 y 20 °C, parece evidente la existencia en la fracción básica de los frutos sobremaduros de otros compuestos inhibitorios del crecimiento del hongo cuya naturaleza desconocemos.

Por otro lado, en lo que respecta a la naturaleza y características de los cambios asociados a las enzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa, todo indica que las dos fases del desarrollo del daño por frío también se reflejan en la evolución de alguno de sus parámetros asociados. Así, las variaciones en la actividad hidrolítica y antifúngica ligadas al patrón de inducción diferencial de quitinasas en la fracción ácida tendrían lugar en plena fase inicial reversible del daño por frío. Sin embargo, una vez que los procesos metabólicos degradativos han avanzado lo suficiente como para impedir la restauración de un metabolismo compensado (5-9 días a 6 °C), se puede observar un claro efecto inductor sobre el patrón de isoenzimas y la actividad hidrolítica en la fracción básica. En este sentido, un patrón semejante ha sido descrito entre las dos fases del desarrollo del estrés hídrico en hojas de trébol con respecto a los niveles de inducción de varias proteínas PR y la actividad enzimática total (Lee *et al.*, 2008).

Diferentes estudios demuestran que la aplicación de un pretratamiento con altos niveles de CO₂ durante 3 días a chirimoyas conservadas a bajas temperaturas ejerce un efecto residual, aumentando su tolerancia al daño por frío y prolongando su periodo de conservación (Escribano *et al.*, 1997; Merodio *et al.*, 1998; Muñoz *et al.*, 1999). En este sentido, este efecto se concretó en un retraso de los cambios en algunos parámetros bioquímicos y fisiológicos (Maldonado *et al.*, 2002b; Maldonado *et al.*, 2004). Del mismo modo, en los frutos tratados se observó un aplazamiento en alguno de los principales cambios descritos en el patrón de defensa de las enzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa. Ese fue el caso de la respuesta inicial observada en la fracción ácida en términos de actividad quitinasa e inducción de la isoenzima AChi24 (Fig. 21). Igualmente, nuestro grupo ha descrito un efecto similar para estas dos enzimas hidrolíticas en uva de mesa pretratada con altas concentraciones de CO₂ durante su conservación a 0 °C (Romero *et al.*, 2006). Por otro lado, esta demora vino acompañada por una inducción coordinada de otras isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa ácidas en los frutos tratados. Además, estos cambios en el patrón de expresión se vieron reflejados por un aumento en los niveles de la actividad antifúngica de la fracción ácida de los frutos tratados tras 9 días a bajas temperaturas. Si bien, el incremento fue considerablemente menor que el observado en la misma fracción de los frutos no tratados después de 3 días a 6 °C. En este sentido, diversos estudios han demostrado como una respuesta combinada de la forma ácida de ambas enzimas se asocia con una mayor efectividad en la resistencia a estreses de origen biótico y abiótico (Hwang *et al.*, 1997; Yu y Griffith, 1999). Por otro lado, la ausencia de daños por frío en los frutos pretratados con CO₂ conservados durante 9 d a 6 °C vino unida a unos niveles moderados y casi estacionarios de la actividad hidrolítica de ambas enzimas y de la actividad antifúngica en la fracción básica. También, los análisis de inmunodetección revelaron la ausencia de la isoenzima BChi33 a lo largo de todo el periodo de conservación a bajas temperaturas (Fig. 25). Estos resultados parecen apoyar la hipótesis de que la inducción de esta última proteína sería una respuesta acontecida en el mesocarpo de chirimoya después de sufrir un cierto grado de desorganización tisular y daño celular irreversible. Asimismo, la inducción específica de las isoenzimas de baja masa molecular BChi14 y AGlu19 como resultado de la combinación de la conservación a 6 °C y del pretratamiento con altas concentraciones con CO₂ no tuvo un efecto manifiesto sobre la actividad hidrolítica o antifúngica

de los extractos respectivos, contrastando con el comportamiento descrito para el resto de isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa inducidas diferencialmente con las bajas temperaturas (Fig. 19 y 20). Por otro lado, el análisis funcional de los extractos proteicos reveló que sólo aquellas fracciones ácidas y básicas procedentes de frutos tratados y conservados a 6°C presentaban una alta actividad crioprotectora *in vitro* (Fig. 79). Estos resultados indicaron que la inducción y acumulación de proteínas crioprotectoras activada por el tratamiento gaseoso puede estar asociada con el incremento de la tolerancia al daño por frío *in vivo* en chirimoya. Asimismo, una vez descartada la participación de dehidrinas u otras proteínas altamente hidrofílicas en este proceso (Close, 1996), la coincidencia entre la evolución de actividad crioprotectora *in vitro* y la presencia de las isoenzimas BChi14 y AGlu19 nos sugieren una posible funcionalidad en este sentido.

En resumen, los resultados obtenidos señalan que en chirimoya las isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa probablemente desempeñen diferentes funciones fisiológicas, estando diferencialmente reguladas por señales endógenas o ambientales. Asimismo, puesto que los cambios en actividad antifúngica o crioprotectora *in vitro* parecen ligados a la presencia de determinadas isoenzimas inducidas diferencialmente, procedimos a su purificación y caracterización con el objeto de evaluar tanto su implicación en las diferentes fases de la maduración y el daño por frío como su relación con los mecanismos de defensa activados por altas concentraciones de CO₂.

2.- Evaluación de una respuesta inicial de proteínas PR frente a un estrés por conservación a bajas temperaturas: inducción de AChi24 y AChi26

La rápida inducción y acumulación de proteínas PR como respuesta a diferentes estreses abióticos (Schraudner *et al.*, 1992; De los Reyes *et al.*, 2001; El Ghaouth *et al.*, 2002; Przymusiński *et al.*, 2004) ha sido descrita en un gran número de especies vegetales, sugiriendo que estas proteínas son sometidas a una instantánea sobreexpresión por señales específicas durante una respuesta general al estrés. Durante la última década, se han obtenido importantes evidencias de la función de las quitinasas y 1,3- β -glucanasas en diferentes niveles fisiológicos y de su implicación en las respuestas a diversos tipos de estrés abiótico. Por otro lado, se ha demostrado la diferente regulación existente entre las isoformas ácidas y básicas de estas enzimas hidrolíticas en plantas de tabaco. Así, en plantas sanas se observó un alto nivel en la expresión de los genes de las isoformas básicas, contrastando con los bajos niveles de las isoformas ácidas. Sin embargo, esta situación se revertió cuando las plantas fueron sometidas a condiciones de estrés tras la aplicación de etileno y citoquininas (Memelink *et al.*, 1990). En otros estudios se ha confirmado la existencia de esta correlación entre la inducción de quitinasas ácidas y diferentes tipos de estrés como la infección viral, el tratamiento con *ethephon*, la radiación UV, un choque térmico, las bajas temperaturas o la acumulación de metales pesados (Brederode *et al.*, 1991; Tamas *et al.*, 1997; Ding *et al.*, 2002; El Ghaouth *et al.*, 2003; Békésiová *et al.*, 2008; Ballester *et al.*, 2010). No obstante, a pesar de su participación en la respuesta a múltiples estreses, resalta la poca bibliografía existente en cuanto al papel jugado por las quitinasas ácidas en la respuesta de las plantas frente al estrés por bajas temperaturas.

Los resultados de los inmunoensayos con anticuerpos anti-(PR-3) obtenidos en este trabajo revelaron que así como la inducción de la isoenzima AChi26 está asociada a la maduración del fruto y condicionada al inicio de la conservación a bajas temperaturas, la isoenzima AChi24 solo se induce inicialmente en chirimoyas conservadas a bajas temperaturas (Fig. 21). Con objeto de descifrar cual puede ser el significado fisiológico de la acumulación de ambas isoenzimas quitinasa, tanto AChi24 como AChi26 fueron purificadas a homogeneidad desde extractos ácidos de mesocarpo de chirimoyas mediante la aplicación de diferentes técnicas y soportes cromatográficos. En este sentido, mientras el aislamiento de AChi24 se basó en la utilización de la cromatografía de intercambio aniónico y la de afinidad de quitina regenerada como pasos selectivos, en el caso de AChi26 se procedió tras la cromatografía de intercambio aniónico a la aplicación de dos etapas consecutivas de cromatografía de afinidad. Aunque el uso de columnas artesanales de quitina regenerada en la purificación de quitinasas está ampliamente extendida en la bibliografía por su alta especificidad y selectividad (Molano *et al.*, 1977; Boller *et al.*, 1988; Cabib, 1988; Yamagami y Funatsu, 1996; Baek *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 2004; Taira *et al.*, 2005a), hay que tener en cuenta el bajo rendimiento de esta técnica, el cual se hace patente por la presencia de una elevada actividad quitinolítica en la fracción no retenida por la columna. No obstante, el rendimiento final de ambas purificaciones se presentó en un estrecho intervalo (7,76-9,01 %) y con un grado de purificación bastante similar (42 y 57 veces para AChi24 y AChi26

respectivamente). En este sentido, aunque para estas enzimas se han descrito rendimientos bajos a causa de la sobreestimación de la actividad quitinolítica de los extractos previos a la purificación cromatográfica (De la Cruz *et al.*, 1992; Inui *et al.*, 1996), de acuerdo a los resultados de otras purificaciones de quitinasas en tejidos semejantes (Lam *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Ho y Ng, 2007), la obtención de 1,44 mg de AChi24 y 1,27 mg de AChi26 por kg de mesocarpio de chirimoya indicaría la eficiencia de los protocolos aplicados.

Con objeto de identificar las isoenzimas AChi24 y AChi26 del mesocarpio de chirimoyas se procedió a utilizar una digestión endoproteolítica con tripsina seguida del análisis de sus productos mediante EM. Para esto último, se aplicaron diferentes técnicas como la obtención del PMF mediante MALDI-TOF o la espectrometría de masas en tandem para fragmentar y caracterizar los diferentes péptidos (MALDI-TOF/TOF). La primera etapa de este estudio correspondió a la correlación del patrón de masas de los péptidos intactos con espectros teóricos generados *in silico* de la base de datos NCBIInr. Sin embargo, tal y como se indica en el apartado 5 de *Resultados*, los datos obtenidos con los espectros PMF de AChi24 y AChi26 no fueron suficientes para una identificación de estas proteínas. Este hecho pudo ser debido a que los péptidos fragmentados correspondían a secuencias pertenecientes a proteínas no descritas en las bases de datos o a secuencias diferentes a las descritas, ya sea por la presencia de modificaciones post-traduccionales, por modificaciones en los genes que codifican dichas proteínas o por posibles errores en la base de datos. Por otro lado, aunque recientemente se han desarrollado un gran número de análisis proteómicos en plantas a partir de sus huellas peptídicas, éstos fueron planteados en organismos cuyo genoma estaba completamente secuenciado, caso de *A. thaliana* o arroz (Boudart *et al.*, 2005; Denby y Gehring, 2005; Agrawal y Rakwal, 2006; Yan *et al.*, 2006). En este sentido, otros estudios proteómicos en maíz se vieron comprometidos en su momento debido a la falta de información en las bases de datos (Porubleva *et al.*, 2001).

Por otro lado, en este trabajo se ha demostrado que la sola utilización de la EM/EM es una excelente herramienta para la identificación de las proteínas mediante la correlación de las masas de los péptidos fragmentados con las secuencias generadas *in silico* desde las bases de datos. Así, la obtención de una secuencia interna de 16 aminoácidos de la isoenzima AChi26 fue suficiente para obtener una identificación estadísticamente significativa con el fragmento de una endoquitinasa bifuncional procedente de semillas de *C. lacryma-jobi* (Ary *et al.*, 1989). Por otro lado, la búsqueda de similitud de la secuencia de este péptido mostró una correspondencia total con una región altamente conservada del dominio catalítico de numerosas quitinasas de plantas (*Anexo II*). Esto último nos sugirió que la isoenzima AChi26 se trata de una genuina quitinasa GH19.

Los algoritmos convencionales de identificación de proteínas, como MASCOT (Perkins *et al.*, 1999), únicamente son capaces de obtener una identificación exacta de los péptidos analizados con las secuencias de las bases de datos (Fenyó, 2000; Liska y Shevchenko, 2003). Sin embargo, debido a que la información de la secuencia para la chirimoya está limitada aproximadamente a 22 entradas de proteínas y a 120 entradas de nucleótidos en la base de datos NCBI (Mayo 2010), son comprensibles las dificultades para identificar proteínas de este fruto mediante aproximaciones

proteómicas basadas en la espectrometría de masas y la búsqueda convencional en las bases de datos (van Wijk, 2001; Liska y Shevchenko, 2003). Por otro lado, en varios estudios en plantas cuyo genoma es desconocido se ha demostrado que se puede superar esta limitación con la utilización de métodos de búsqueda avanzados basados en la similitud de secuencia (Liska y Shevchenko, 2004; Jorge *et al.*, 2005; Hjerno *et al.*, 2006; Sididique *et al.*, 2006; Baginsky *et al.*, 2007; Samyn *et al.*, 2007; Hatano y Hamada, 2008; Chaves *et al.*, 2009). Así, nosotros usamos el algoritmo de búsqueda de similitud de secuencia FASTS para explorar en las proteínas y ESTs de las bases de datos. FASTS es una herramienta que utiliza múltiples secuencias cortas de péptidos para identificar secuencias homologas de proteínas en las bases de datos. Este algoritmo hace las búsquedas con las secuencias de los péptidos desordenadas, evaluando automáticamente todos los posibles reordenamientos de estos péptidos. A esta última ventaja hay que sumar la rapidez del proceso de búsqueda, gracias a que dicho algoritmo está basado en una estrategia de comparación heurística en formato FASTA y a que utiliza un alineamiento de secuencias por probabilidad. En este sentido, el análisis de los tres péptidos secuenciados *de novo* de AChi24 reveló que éstos presentaban una elevada similitud con diferentes regiones del dominio catalítico del producto de la traducción del gen que codificaba una quitinasa de clase IV de *V. pseudoreticulata*. Asimismo, pudimos constatar la bondad de esta identificación positiva al comparar el valor de la significancia estadística obtenida con los descritos en la bibliografía (Samyn *et al.*, 2006; Samyn *et al.*, 2007; Tannu y Hemby, 2007; Hatano y Hamada, 2008).

Sin embargo, la identificación de las isoenzimas AChi24 y AChi26 no sólo se fundamentó en la similitud de fragmentos de sus secuencias con regiones altamente conservadas del dominio catalítico de quitinasas GH19. El análisis de la secuencia aminoacídica de este dominio en cualquier quitinasa de las familia I, II y IV muestra las grandes similitudes existentes, especialmente en las dos primeras (Neuhaus, 1999). Este mimetismo observado a lo largo de diferentes especies vegetales facilita la identificación por EM, ya que es probable que proteínas que compartan secuencias similares desempeñen una misma función. Pero por esta misma razón, cuesta diferenciar a qué familia nos estamos refiriendo si no atenemos a sus elementos diferenciales (presencia del dominio CBD, delecciones puntuales, etc.). Una estrategia indirecta es reparar en sus propiedades bioquímicas y como se reflejan éstas en la secuencia de la enzima. En este sentido, varias características bioquímicas también parecen apuntar en la dirección señalada por los resultados detectados mediante EM. En el caso de la identificación de AChi24 con una quitinasa de la clase IV, se puede destacar su capacidad de unión a una matriz de quitina regenerada y el valor de su masa molecular. Ha sido ampliamente demostrado como la adsorción sobre una superficie de quitina insoluble está intrínsecamente asociada a la presencia de un dominio CBD en la estructura de la proteína, el cual es exclusivo de las enzimas quitinasa de clase I y IV (Iseli *et al.*, 1993; Yamagami y Funatsu, 1996; Taira *et al.*, 2005a; Taira *et al.*, 2005b). Una de las características que diferencian a las quitinasas de clase IV con respecto a las de clase I es su relativa baja masa molecular (20-30 kDa) debida a una serie de delecciones en el dominio catalítico (Neuhaus, 1999; Ubhayasekera *et al.*, 2009). Ambos factores: una masa molecular menor de 30 kDa y la potencial presencia de un dominio CBD, confirmarían que esta isoenzima pueda

catalogarse como una enzima quitinasa de clase IV. Uno de los aspectos más llamativos durante la purificación de AChi24 fue la ausencia de la isoenzima AChi26 en la fracción eluida de la columna quitina, aun encontrándose ésta en cantidades detectables en la fracción ácida de partida (Fig. 21). En este sentido, este hecho indicaría la ausencia del dominio CBD en su estructura primaria, lo cual junto a una masa molecular que oscila entre 27 y 28 kDa y un carácter ácido son los rasgos más distintivos de las quitinasas de clase II. Por tanto, aunque la ausencia de más información acerca de la secuencia de AChi26 no nos permite afirmar la clase a la que pertenece, las características bioquímicas de esta isoenzima apuntarían a un posible encuadramiento en la clase II.

Aunque en este trabajo no hemos evaluado directamente la localización intracelular de estas enzimas, existen una serie de indicios que apoyan el hecho de que las dos isoenzimas quitinasa ácidas anteriores se encuentran localizadas en el espacio extracelular del mesocarpo de la chirimoya. Es casi una característica inherente a las proteínas PR, y existen multitud de ejemplos en la bibliografía, la presencia de isoformas ácidas y básicas en cada una de sus familias, acumulándose generalmente estas últimas en la vacuola, mientras que las isoformas ácidas son secretadas habitualmente al medio extracelular (Neuhaus, 1999; van Loon, 1999; Arie *et al.*, 2000). Por tanto, el marcado carácter ácido de las isoenzimas AChi24 y AChi26, con un valor de pI similar a otras quitinasas ácidas de plantas (Flach *et al.*, 1992; Kirsch *et al.*, 1993; Vogelsang y Braz, 1993; Taira *et al.*, 2005a; Taira *et al.*, 2005b), señalaría su situación extracelular. Asimismo, la información relativa a la clase a la que pertenece la isoenzima AChi24 también aludió a esta característica. Concretamente las quitinasas de clase IV han sido emplazadas en el medio extracelular debido a la ausencia del péptido señal CTP en el extremo C-terminal de su secuencia, el cual es necesario para el envío de estas enzimas hacia la vacuola (De Tapia *et al.*, 1987; Linthorst *et al.*, 1990; Mikkelsen *et al.*, 1992; Danhash *et al.*, 1993).

Los pH óptimos de las isoenzimas AChi24 y AChi26 se distribuyeron en un estrecho rango (5 y 6 respectivamente; Fig. 44A). Estos valores son típicos de las enzimas quitinasa de plantas, cuyos pH óptimos suelen situarse en un intervalo entre 4,5 y 6 (Pegg, 1988; Lin *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1996a; Andersen *et al.*, 1997; Krishnaveni *et al.*, 1999; Baek *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003; Fernandez-Caballero *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). El análisis del comportamiento catalítico de ambas isoenzimas frente a la temperatura nos mostró sus grandes similitudes en lo que respecta a su rango de actuación. Sin embargo, resulta significativo la mayor temperatura optima de reacción de AChi24, situándose cerca de 8 °C por encima de la detectada para AChi26 (Fig. 47A). No obstante, los valores de este último parámetro se ajustaron dentro del rango encontrado en la bibliografía para otras plantas, y que se ubica entre 40 y 60°C (Vogelsang y Barz, 1993; Hung *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Troung *et al.*, 2003; Taira *et al.*, 2005a; Taira *et al.*, 2005b; Fernandez-Caballero *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Los resultados de estos últimos trabajos citados también reflejaron la mayor amplitud del intervalo de temperatura donde se detecta actividad enzimática para AChi24 y AChi26. Así, frente a rangos que oscilan entre 25 y 40°C, estas isoenzimas mantuvieron cerca de un 50 % de la actividad máxima durante más de 50°C.

Por otro lado, AChi24 y AChi26 también mostraron una cierta semejanza en lo que respecta a su estabilidad a diferentes condiciones de pH extremo y a elevadas temperaturas (Fig. 44B y 47B). En este sentido, estas isoenzimas ácidas fueron estables en un rango de pH entre 2 y 11 unidades durante dos horas a temperaturas moderadas (35-45 °C). Al comparar este parámetro con el obtenido en otras quitinasas de plantas se constata que tanto AChi24 como AChi26 presentan uno de los rangos de estabilidad de pH más amplios detectados, ya que el comportamiento de estas enzimas suele implicar una elevada estabilidad a pH fuertemente ácidos o alcalino, pero no a ambos (Tsukamoto *et al.*, 1984; Otha *et al.*, 1995; Yamagami *et al.*, 1997; Taira *et al.*, 2005b). Sin embargo, resulta curioso observar como los escasos ejemplos de similares quitinasas ácidas proceden de plantas distribuidas en zonas tropicales o subtropicales (Taira *et al.*, 2005a; Taira *et al.*, 2005b). Por otro lado, mientras AChi24 mostraba una termoestabilidad similar a la de otros ejemplos de la bibliografía, AChi26 se situó dentro del grupo de quitinasas de plantas más estables a altas temperaturas, reteniendo su actividad a 80°C durante 120 minutos (Tsukamoto *et al.*, 1984; Otha *et al.*, 1995; Andersen *et al.*, 1997; Yamagami *et al.*, 1997; Shih *et al.*, 2001; Li *et al.* 2003; Taira *et al.*, 2005a; Taira *et al.*, 2005b; Devavratha y Lalitha; 2008). No obstante, hay que destacar la resistencia a la desnaturalización de AChi26 frente a varias condiciones fisicoquímicas adversas, siendo esta isoenzima uno de los pocos ejemplos de quitinasas de origen vegetal que conservan su actividad catalítica a elevadas temperaturas y pH extremos (Lam *et al.*, 2000; Kuo *et al.*, 2008).

De acuerdo a los resultados experimentales de este trabajo, el origen de la mayor estabilidad de las isoenzimas AChi24 y AChi26 pudiera situarse en la presencia de elementos que estabilizasen su estructura terciaria. Por un lado cabe destacar la débil glicosilación de la isoforma AChi26, visible tras su tinción con el reactivo de Schiff, y de la cual desconocemos tanto la naturaleza del enlace y el tipo de polisacárido unido como la cantidad exacta de carbohidratos unidos a la proteína (Fig. 52). En este sentido, esta clase de modificación postraduccional ya ha sido observada en un conjunto heterogéneo de quitinasas purificadas de plantas (de Jong *et al.*, 1992; Kirsch *et al.*, 1993; Melchers *et al.*, 1994; Nielsen *et al.*, 1994; Ancillo *et al.*, 1999; Ponath *et al.*, 2000; Taira *et al.*, 2005a; Taira *et al.*, 2005b; Devavratha y Lalitha; 2008; Kuo *et al.*, 2008; Kumar Patel *et al.*, 2009; Taira *et al.*, 2009). Si bien la posible relevancia funcional de esta modificación en esta clase de enzimas no es del todo conocida, Berman y Lasky (1985) y Langsford *et al.*, (1987) ya establecieron la importancia de la glicosilación en la estabilidad de las proteínas, favoreciendo su solubilidad y haciéndolas más resistentes a la degradación por parte de proteasas y condiciones extremas de pH. Apoyando este último supuesto, diversos estudios han mostrado como la glicosilación facilita la formación de una estructura secundaria correcta (Wyss *et al.*, 1995), la generación de puentes disulfuro (Olson *et al.*, 1988) o aumenta la estabilidad global de la proteína al proporcionar una mayor rigidez a los residuos próximos a la zona de glicosilación (Garrigue-Antar *et al.*, 2002). En este sentido, en lo que respecta a quitinasas, Devavratha y Lalitha (2008), Kumar Patel *et al.* (2009) o Taira *et al.* (2009) han apuntado que la presencia de glicoestructuras en quitinasas puede ser un factor contribuyente en una mayor estabilidad termal. Asimismo, la

caracterización realizada con quitobiosidasas bacterianas también expuso la importancia de la N-glicosilación en la termoestabilidad de estas enzimas (Harman *et al.*, 1993).

Por otro lado, los datos de movilidad electroforética en el análisis SDS-PAGE de la isoforma AChi24 muestra de forma indirecta la presencia de múltiples enlaces disulfuro en el estado nativo de esta proteína (Fig. 50). Como sugiere Kamino (2001), puesto que la muestra disuelta en un medio no reductor migraba de un modo más rápido que tras su incubación con β -mercaptoetanol, es factible suponer una pérdida de compactación de la proteína por la ruptura de estos enlaces internos. En este sentido, varios autores han constatado la presencia de varios enlaces disulfuro en el dominio catalítico y en el dominio CBD de otras quitinasas pertenecientes a la familia GH19. Esta última región del extremo N-terminal, presente también en las quitinasas de clase IV, está caracterizada por un alto número de cisteínas y un plegamiento conservado, aportando cinco enlaces disulfuro fácilmente reducibles con β -mercaptoetanol (Shinshi *et al.*, 1990; Yamagami y Funatsu, 1996; Andersen *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 2007). Por otro lado, la formación de puentes disulfuro es una de las modificaciones postraduccionales más importantes en una célula y muy frecuente en las proteínas extracelulares. La estabilización conformacional asociada a los puentes disulfuro de una proteína esta guiada por varios factores: a) entrópicos, a través de la desestabilización de su forma desnaturalizada y; b) entálpicos, mediante la formación de diferentes interacciones favorables que facilitan, por ejemplo, el establecimiento del núcleo hidrofóbico de la proteína plegada (Thornton, 1981; Darby y Creighton, 1995; Sakharov y Sakharova, 2002).

Los exhaustivos análisis realizados sobre los aspectos cualitativos y cuantitativos de la actividad antifúngica de las quitinasas de plantas contrastan con lo poco que se conoce acerca de las características cinéticas de estas enzimas, llegando al punto de obviarse este aspecto en la mayor parte de las publicaciones de referencia que tratan sobre la caracterización de quitinasas purificadas de diferentes tejidos vegetales. Esto último es debido en parte a la utilización habitual de quitina coloidal como sustrato enzimático. Esta sustancia, como polímero insoluble con un heterogéneo grado de polimerización, resulta inapropiada para la evaluación de los parámetros cinéticos en el periodo inicial de la reacción (Zhang *et al.*, 1999). Por esa razón, en este trabajo de investigación se ha optado por la uso de dos tipos de compuestos. Por un lado, resulta muy útil acometer los análisis cinéticos de las quitinasas con el empleo de derivados de quitina solubles, caso de CM-Chitin-RBV, el cual está unido a un grupo cromóforo para facilitar la detección de la hidrólisis. La otra alternativa de ensayo aplicada ha consistido en la utilización de cortos oligómeros de quitina fusionados al grupo fluoróforo 4-MU. Estos compuestos retienen la forma de silla de los anillos de piranosa de los azúcares, sugiriendo que pueden ser utilizados como análogos de los quitoooligosacáridos naturales (Honda *et al.*, 2000). Sin embargo, en esta metodología, únicamente la liberación del grupo 4-MU emite fluorescencia, no siendo detectadas las reacciones de hidrólisis entre dos residuos del oligosacárido (Omero *et al.*, 2001). Esta desventaja inicial ha sido solventada con la síntesis y uso posterior de oligosacáridos de varios grados de polimerización. Adicionalmente, el estudio de las cinéticas de degradación de estos

oligómeros de quitina ha permitido no sólo la obtención de los parámetros cinéticos, sino también las características del mecanismo de hidrólisis de las isoformas quitinasa.

Con respecto a la cinética de AChi24 y AChi26, se observó como las curvas de las respectivas representaciones de Hanes-Wolf se ajustaban al mecanismo de Michaelis-Menten (Fig. 53-56). Asimismo, los resultados de las cinéticas de degradación de los quitoooligosacáridos sintéticos y la relación entre las k_{cat} de sustratos con diferente grado de polimerización nos permiten señalar como una de las isoenzimas ácidas (AChi26) tiende a liberar preferentemente monómeros de NAG, siendo la única enzima purificada en este trabajo de investigación capaz de hidrolizar el monosacárido 4MU- β -GlcNAc. Estos hechos definirían a AChi26 como una enzima 1,4- β -(N)-acetilhexosaminidasa (GH20), lo cual parece paradójico teniendo en cuenta que ha sido identificada por EM como una quitinasa GH19. Con todo, se ha descrito como algunas quitinasas de clase III presentan la capacidad de hidrolizar oligómeros de NAG liberando monómeros de un modo similar al observado en 1,4- β -(N)-acetilhexosaminidasas (Kragh *et al.*, 1993; Nielsen *et al.*, 1993; Brunner *et al.*, 1998). Como caso típico, nos encontramos con el caso de una quitinasa de clase III purificada de remolacha que hidroliza de un modo más eficiente el dímero (GlcNAc)₂ que otros oligómeros de NAG o quitina (Nielsen *et al.*, 1993). Asimismo, resulta llamativa la capacidad hidrolítica de AChi26 sobre un derivado de quitina soluble (CM-Chitin-RBV). La bibliografía existente muestra una variabilidad absoluta en este tema, puesto que frente a lo reflejado por varios autores con 1,4- β -(N)-acetilhexosaminidasas purificadas de plantas incapaces de hidrolizar quitina coloidal o derivados solubles de ésta (Barber y Ride, 1989; Pócsi *et al.*, 1990; Jin *et al.*, 2002), nos encontramos con multitud de ejemplos en sentido contrario (Li y Li, 1970; Bouquelet y Spik, 1978; Yi, 1981; Carratú *et al.*, 1985; Oikawa *et al.*, 2003). De acuerdo a todos estos resultados, se puede especular con la existencia de algún tipo de vínculo evolutivo entre las enzimas 1,4- β -(N)-acetilhexosaminidasas y las quitinasas pertenecientes a la familia GH19. En este sentido, una hipótesis similar ha sido planteada recientemente para las quitinasas de la familia GH18 (Souza *et al.*, 2008). Apoyando estos planteamientos, nos encontramos un trabajo ampliamente citado de Henrissat *et al.* (1995) acerca de la conservación de una maquinaria catalítica común en la mayoría de familias de glicosil hidrolasas. En este estudio se concluye que a pesar de que los diferentes eventos evolutivos han generado una mayor diversificación en la especificidad de sustrato, la propia presión evolutiva ha conservado invariablemente los residuos catalíticos de estas enzimas. De todos modos, resultaría conveniente la obtención de más información acerca de la secuencia de la isoenzima AChi26 para obtener unas conclusiones más precisas acerca de esta posible similitud.

A pesar de las características singulares de la isoenzima AChi26, ya que se trataría de la primera quitinasa perteneciente a la familia GH19 con actividad 1,4- β -(N)-acetilhexosaminidasa descrita hasta la fecha en frutos, sus propiedades enzimáticas fueron comparables a las de otras 1,4- β -(N)-acetilhexosaminidasas de plantas frente a sustratos fluorogénicos. Así, la afinidad de AChi26 ($K_m = 0,18$ mM) se situó dentro del rango de valores (0,04-1,13 mM) encontrado frente a *p*NP-GlcNAc, un compuesto estructural y químicamente similar al monosacárido usado en este trabajo de investigación. Con respecto a la velocidad de hidrólisis, el valor aparente de la k_{cat} (11,8

s^{-1}) también se encontraba en el intervalo descrito ($2,41-171,1 s^{-1}$) para enzimas de otras plantas frente a 4-MU-GlcNAc (Bouquelet y Spik, 1978; Giordani *et al.*, 1992; Choi y Gross, 1994; Chang *et al.*, 1998; Strasser *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2008).

Por otro lado, los ensayos cinéticos con los sustratos fluorogénicos nos permitieron concluir que la isoenzima AChi24 tiende a romper los enlaces 1,4- β glicosídicos de la quitina de un modo aleatorio, clasificándose consecuentemente como una endoquitinasa. Asimismo, tal y como hemos expuesto en el apartado 8.2.1 de los *Resultados*, aunque AChi24 mostró una actividad detectable frente a 4MU- β -(GlcNAc)₂, es muy probable que la magnitud de este fenómeno esté influenciada por la naturaleza del sustrato. En este sentido, esta ausencia de especificidad absoluta de la isoenzima AChi24 no tiene por qué comprometer su clasificación como endoquitinasa si nos fijamos en el ratio de las k_{cat} de la degradación de los compuestos sintéticos (Tabla 19). Así, una magnitud sensiblemente inferior a 1 reafirmó un endomecanismo de hidrólisis de acuerdo a lo expuesto por Robbins *et al.* (1988).

Otro aspecto interesante de la cinética de las isoenzimas AChi24 y AChi26 fue constatar las importantes diferencias en los valores de sus k_{cat} en la degradación de 4MU- β -(GlcNAc)₃. En consonancia con su mecanismo de hidrólisis, el valor de la constante catalítica para la endoquitinasa AChi24 fue cuatro veces mayor que la observada para la isoenzima AChi26. Sin embargo, en el caso de la K_m , las diferencias entre estas dos isoenzimas no fueron tan acusadas (Tabla 16). Aunque uno de los factores determinantes en la afinidad de las quitinasas en plantas parece encontrarse en la presencia del dominio CBD (Iseli *et al.*, 1993; Yamagami y Funatsu, 1996; Taira *et al.* 2002), los resultados de AChi24 y AChi26 indicaron que esta región ejercía una influencia menor, casi residual, en la capacidad de unión frente a pequeños sustratos oligoméricos. Esta afirmación estaría en consonancia con lo observado en otras glicosil hidrolasas como xilanasas (GH10) o quitinasas (GH18) (Gill *et al.*, 1999; Arakane *et al.*, 2004). Asimismo, la valoración conjunta de ambos parámetros cinéticos implicó que la eficiencia catalítica de AChi24 fuera notablemente superior a la de AChi26. Por otro lado, si atendemos a los estudios cinéticos realizados con otras quitinasas purificadas en plantas para este trisacárido sintético, se puede constatar como AChi24 y AChi26 poseían una K_m (0,12-0,14 mM) significativamente superior a la detectada en aquenios de *Ficus amkeotsang* (0,076 mM; Li *et al.*, 2003) o en hojas de cebada (0,033 mM; Hollis *et al.*, 1997). Frente a esta menor afinidad, ambas isoenzimas quitinasa ácidas de chirimoya presentaron una constante catalítica que superaba ampliamente a las calculadas para los anteriores organismos (0,089 y 0,006 s^{-1} , respectivamente), alcanzado diferencias de hasta tres ordenes de magnitud si atendemos a la comparativa establecida entre la k_{cat} de AChi24 y la enzima aislada en cebada. La influencia de ambos factores, afinidad y velocidad, dio lugar a una eficiencia catalítica para AChi26 y AChi24 ($k_{cat}/K_m = 27,49$ y $149,38 s^{-1} mM^{-1}$) marcadamente mayor que la encontrada para las otras dos quitinasas anteriores (1,17 y 0,18 $s^{-1} mM^{-1}$, respectivamente). En este sentido, este factor indicaría el alto potencial hidrolítico *in vitro* de estas dos isoenzimas ácidas frente a quitooligosacáridos, especialmente en el caso de AChi24.

Si atendemos al valor de los parámetros cinéticos frente a CM-Chitin-RBV, resulta significativa la diferencia en los valores de la K_m entre ambas isoenzimas, mostrando AChi24 una

afinidad casi 7 veces mayor que la detectada para AChi26 (Tabla 16). En este sentido, la presencia del dominio CBD en la estructura primaria de AChi24 podría ser responsable de este aumento en la afinidad. De un modo similar al observado en otras quitinasas de plantas (Iseli *et al.*, 1993; Yamagami y Funatsu, 1996; Taira *et al.* 2002), este dominio incrementa la capacidad de unión de la enzima frente a sustratos de elevada masa molecular o insolubles. La explicación química a este fenómeno se encuentra en la presencia de varios aminoácidos aromáticos altamente conservados en la secuencia del dominio CBD, los cuales establecen fuertes interacciones hidrofóbicas con la piranosa del sacárido (Sehn y Jacobs-Lorena, 1999; Taira *et al.*, 2005b). La influencia de este dominio en el valor de la afinidad por esta clase de sustratos quedó elegantemente plasmada en el estudio realizado por Arakane *et al.* (2004) con varias quitinasas de fusión. Así, la construcción y caracterización de diferentes proteínas recombinantes formadas por el dominio catalítico de la quitinasa del insecto *Manduca sexta* y por uno o dos dominios CBD, mostró como éstas presentaban magnitudes significativamente menores de la K_m que la enzima control. Por otro lado, no se observaron prácticamente diferencias en la magnitud de la k_{cat} entre ambas isoenzimas ácidas. Este resultado sugiere que la actividad catalítica de estas enzimas frente a polisacáridos de gran tamaño es independiente de sus propiedades de unión a la quitina, coincidiendo con lo observado en estudios realizados con isoformas quitinasa ácidas de tabaco (Legrand *et al.*, 1987; Iseli *et al.*, 1993). En suma, los valores discrepantes de las constantes de especificidad de las isoenzimas AChi24 y AChi26 reflejaron que la k_{cat}/K_m estaba más influenciada por la afinidad al polisacárido que por las propiedades intrínsecas del centro catalítico de la enzima. Este fenómeno fue el contrario al observado para los sustratos fluorogénicos e indica el importante papel que juegan los dominios CBD en la eficiencia catalítica de las quitinasas frente a sustratos poliméricos. Por otra parte, debido a la ausencia de análisis cinéticos de quitinasas de plantas con este sustrato en la bibliografía, se ha optado por efectuar un estudio comparativo de sus niveles de afinidad frente a CM-Chitin-RBV con un sustrato análogo estructuralmente (glicol quitina). En este sentido, los valores de K_m de las isoenzimas ácidas AChi24 y AChi26 se encontraron dentro del rango descrito para otras quitinasas de plantas frente a glicol-quitinina (Graham y Sticklen, 1994; Hung *et al.*, 2002; Truong *et al.*, 2003).

La combinación 1:1 de las isoenzimas AChi24 y AChi26 en una mezcla de reacción con CM-Chitin-RBV causó un significativo incremento de la actividad hidrolítica, indicando la existencia de una fuerte interacción sinérgica entre estas dos quitinasas (Fig. 70). La degradación sinérgica de quitina por varias quitinasas es un fenómeno bien conocido en bacterias, hongos e insectos (Fukamizo y Kramer, 1985a; Fukamizo y Kramer, 1985b; Suzuki *et al.*, 2002; Duo-Chuan *et al.*, 2005; Fukamizo *et al.*, 2006). En todos estos casos se trata de mezclas binarias de una endoquitinasa y una 1,4- β -(N)-acetilhexosaminidasa capaces de hidrolizar la quitina por separado. Así, en estos sistemas experimentales la endoquitinasa catalizaría la hidrólisis sucesiva de quitina o quitooligosacáridos generando oligosacáridos de bajo grado de polimerización [(GlcNAc)₂₋₃]. Éstos últimos serían degradados por la 1,4- β -(N)-acetilhexosaminidasa a NAG. Sin embargo, también se observaría una moderada hidrólisis de quitina u oligosacáridos de gran tamaño por parte de esta segunda enzima. En este sentido, las características enzimáticas de nuestro sistema

binario, con una enzima con un evidente endomecanismo (AChi24) y otra enzima con actividad 1,4- β -(N)-acetilhexosaminidasa (AChi26), concuerdan dentro de los parámetros descritos en los estudios arriba reseñados. Aunque se han encontrado estudios semejantes con quitinasas de origen fúngico expresadas en plantas transgénicas (Bolar *et al.*, 2001), resulta llamativa la casi ausencia de estudios cinéticos en la bibliografía con combinaciones de quitinasas procedentes exclusivamente de plantas y frutos. No obstante, un trabajo de Inui *et al.* (1996) constató el efecto sinérgico existente entre quitinasas de clase Ib y clase III con diferente especificidad de sustrato sobre quitina, evidenciando la importancia de una combinación de mecanismos de hidrólisis diferentes a la hora de acelerar la degradación del sustrato.

Por otro lado, en algunos ejemplos de estos sistemas sinérgicos de glicosil hidrolasas se observa la presencia de un periodo de adaptación o fase de retraso, caracterizado por la presencia de un perfil sigmoideo en las curvas que representaban la evolución de la reacción con respecto al tiempo (Klesov, 1982; Klesov y Grigorash, 1982; Fukamizo y Kramer, 1985a). Nuestro caso presenta una tendencia completamente opuesta, con un mayor grado de sinergismo, y por tanto de hidrólisis del sustrato, en las primeras etapas del periodo de reacción (Tabla 21). Estos resultados pueden explicarse de acuerdo a dos factores no necesariamente excluyentes: a) una elevada efectividad de AChi24 en la producción de productos intermedios solubles a partir de CM-Chitin-RBV y, b) la isoenzima AChi26 es capaz de hidrolizar rápidamente estos productos intermedios a NAG. Adicionalmente, Fukamizo y Kramer (1985b) defienden la importancia de las características del sustrato en esta mayor tasa de hidrólisis inicial, siendo más probable en presencia de polímeros que de oligosacáridos solubles. En este sentido, otros autores han reflejado un comportamiento similar en el efecto sinérgico de la degradación de paredes celulares por parte de xilanasas y celulasas microbianas (Murashima *et al.*, 2003).

En plantas, se considera que las quitinasas GH19 forman parte de la estrategia de defensa frente a patógenos fúngicos constituidos por quitina (Chisholm *et al.*, 2006). En este sentido, las isoenzimas AChi24 y AChi26, además de poseer una elevada eficiencia hidrolítica frente a diferentes quito oligosacáridos o CM-Chitin-RBV, mostraron una significativa actividad antifúngica frente al hongo *B. cinerea*. Además, aunque su capacidad inhibitoria sobre el crecimiento del micelio fue idéntica a bajas concentraciones de enzima (10 μ g), un incremento en esta variable se reflejó en una duplicación de los valores de AChi24, siendo 1,5 veces más efectiva que AChi26 (Tabla 25). Esta diferencia en la sensibilidad del hongo a estos dos isoenzimas podría estar originada en la presencia o ausencia de determinados motivos en la secuencia de la proteína. En este sentido, muchos estudios han incidido en el papel del dominio CBD en la actividad antifúngica de las quitinasas. Los primeros resultados en este sentido encontraron una ausencia total de actividad antifúngica en quitinasas ácidas de clase II (Sela-Buurlage *et al.*, 1993). Aunque este hecho podría asociarse, entre otros factores, a la falta del dominio CBD, investigaciones posteriores han comprobado que esta región no es necesaria *per se* para el desarrollo de actividad antifúngica (Iseli *et al.*, 1993; Suárez *et al.*, 2001; Taira *et al.*, 2002; Truong *et al.*, 2003; Shenoy *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2007). Sin embargo, sin un dominio CBD, la región catalítica de la enzima difundiría desde la pared celular del hongo después de una única reacción de hidrólisis,

disminuyendo las propiedades antifúngicas de la enzima. En este sentido, mientras que la isoenzima AChi24 presentó al menos dos zonas de unión a la quitina, la isoenzima AChi26 únicamente poseía una, pudiendo situarse en este aspecto una de las razones de su diferencia de actividad antifúngica.

Está ampliamente demostrada la actividad inhibitoria de muchas quitinasas GH19 sobre un amplio rango de hongos patogénicos (Schlumbaum *et al.*, 1986; Mauch *et al.*, 1988b; Sela-Buurlage *et al.*, 1993). Sin embargo, estas enzimas no son igualmente efectivas en todas las especies o en las diferentes cepas de una misma especie, llegando a no mostrar efectos inhibitorios sobre el crecimiento de las hifas del hongo (Broekhaert *et al.*, 1988; Arlorio *et al.*, 1991; Verburg y Huynh, 1991). En este sentido, la elección de *Botrytis cinerea* como patógeno modelo no resultó casual. Éste hongo necrotrófico es la principal causa de la podredumbre aparecida durante la conservación post-recolección de diferentes productos vegetales perecederos, causando grandes pérdidas económicas. Además, se trata de un hongo relativamente resistente a la acción por solitario de varias quitinasas de plantas (Mauch *et al.*, 1988b; Broekhaert *et al.*, 1988). Asimismo, hay que tener en consideración su capacidad para sobrevivir en ambientes hostiles repletos de compuestos antifúngicos y su facultad de infectar frutos a bajas temperaturas, incluyendo chirimoyas durante su conservación prolongada a 6 °C (Mansfield, 1980; Merodio y De la Plaza, 1997; van Kan, 2006). Por otro lado, aunque distintas quitinasas procedentes de plantas han mostrado una moderada actividad antifúngica *in vitro* frente a esta especie, las cantidades requeridas para alcanzar una significativa inhibición de su crecimiento son relativamente elevadas (16-140 µg). En este sentido, las concentraciones de AChi24 y AChi26 que provocaron la inhibición del crecimiento de las hifas del hongo se encontraron dentro de este rango (Salzman *et al.*, 1998; Ano *et al.*, 2003; Guan *et al.*, 2008; Fernández-Caballero *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009).

Nuestros resultados indicaron también que la eficacia antifúngica de las isoenzimas AChi24 y AChi26 se vio incrementada significativamente cuando se utilizaron mezclas binarias en una proporción 1:1 (Tabla 26). Así, este evidente efecto sinérgico, coincidente al observado en el ensayo de actividad hidrolítica, pudo estar originado en el modo de acción complementario de ambas isoenzimas. Por un lado, AChi24 degradaría la pared celular mediante un ataque hidrolítico de los extremos apicales de las hifas, los cuales están formados por microfibrillas de quitina recién sintetizada que todavía no ha cristalizado firmemente. Esto último encajaría con las bajas actividades mostradas por las quitinasas GH19 hacia formas muy cristalizadas de quitina y con la elevada eficiencia catalítica de AChi24 frente a derivados solubles de quitina (Raikhel *et al.*, 1993; Kawase *et al.*, 2006). Como resultado directo de la acción de esta endoquitinasa, los quitoooligosacáridos generados proporcionarían una mayor cantidad de sustratos accesibles para la isoenzima AChi26. En última instancia, la degradación de estos quitoooligosacáridos prevendría el entrecruzamiento de las cadenas nacientes de quitina o de las microfibrillas de quitina y β-glucano, dando lugar a una alteración en la morfogénesis de la pared celular y del crecimiento de la hifa del hongo.

Aparentemente, y a la luz de su considerable actividad antifúngica *in vitro*, las isoenzimas AChi24 y AChi26 purificadas del mesocarpo de chirimoyas poseen todos los requisitos necesarios para desarrollar un sistema de protección *in vivo* frente a hongos fitopatógenos durante las primeras etapas de su conservación a bajas temperaturas. Sin embargo, los resultados de trabajos previos únicamente han constatado la presencia de signos visibles de ataque fúngico tras más de 15 días de conservación en un intervalo de bajas temperaturas que oscilaba entre 7 y 11°C (Morales y Cooper, 1977; Reginato y Lizana, 1980; Marín, 1997; Pardo, 2001; Pentzke, 2006). Asimismo, la ausencia de claros síntomas de daño por frío en la pared celular de frutos conservados 3 días a 6°C (Fig. 11) indicaría que las barreras estructurales de las células del mesocarpo se mantienen intactas. De este modo, el fruto en este punto de la conservación no sería *a priori* menos susceptible al ataque por patógenos que los frutos recién recolectados. Aunque estos datos no excluyen la posibilidad de una colonización fúngica en estado quiescente (Prusky, 1996), resulta difícil asumir que tanto AChi24 como AChi26 estén implicados en un mecanismo de defensa directo por un ataque por fitopatógenos a lo largo de la primera fase de la conservación a bajas temperaturas. Por tanto, la inducción de AChi24 y AChi26 podría asociarse como parte de una respuesta temprana o inicial del mesocarpo de la chirimoya a las bajas temperaturas, constituyendo más bien un sistema de defensa programada capaz de proteger al fruto de potenciales microorganismos saprofitos. Además, dado que estas isoenzimas quitinasa muestran diferentes especificidades por los sustratos, este mecanismo preventivo inducido por las bajas temperaturas podría actuar de un modo directo sobre el fitopatógeno o indirectamente generando elicitores de otras respuestas de defensa (Fig. 5).

Por otro lado, nuestros resultados constatan la hipótesis de que estas proteínas ‘relacionadas con la patogénesis’, contrariamente a su nombre, no tienen por qué estar únicamente relacionadas con un estrés de origen biótico. En este sentido, puesto que prácticamente ante cualquier condición de estrés abiótico (p.ej: calor, frío, sequía, exceso de salinidad, anaerobiosis, etc.) es conocida la respuesta de las plantas para la síntesis de nuevas proteínas, podemos atribuir la inducción de las isoenzimas AChi24 y AChi26 como un componente más de una respuesta de defensa general, siendo independiente ésta del estrés en particular. Además, recordar que la respuesta de las plantas al estrés constituye una red de rutas de señalización entrecruzadas. Esto se debe parcialmente al hecho de que los desordenes fisiológicos provocados por los diversos tipos de estrés pueden requerir respuestas protectoras superpuestas (Knight y Knight, 2001; Fujita *et al.*, 2006). En el caso particular de la chirimoya, estudios previos de nuestro grupo han establecido la acumulación de ácidos orgánicos y la disminución del pH en el citoplasma como una característica particular de este fruto durante su conservación a bajas temperaturas (Muñoz *et al.*, 2001; Maldonado *et al.*, 2004). Asimismo, este hecho coincide con lo expuesto por otros autores (Yoshida *et al.*, 1999; Kawamura, 2008), los cuales han establecido la acidificación citoplasmática como uno de los eventos primarios del daño por frío en plantas sensibles a las bajas temperaturas. Por otro lado, entre las señales intermedias cargadas de baja masa molecular, se ha establecido que los protones (o el pH intracelular) pueden ser modulados dinámicamente y ser útiles en la transferencia de información de la planta

(Roos, 2000; Roos, 2001). Incluso, varios autores han argumentado que la acidificación citoplasmática, común a muchos tipos de estrés biótico y abiótico (Felle, 2001), actuaría como un inductor de la síntesis de fitoalexinas, de la enzima PAL o de proteínas PR (He *et al.*, 1998; Lapous *et al.*, 1998; Schaller y Oecking, 1999; Armero y Tena, 2001). En este sentido, la coincidencia entre la inducción de AChi24 y AChi26 en frutos conservados a 6 °C y el cambio del pH intracelular sugiere que la acidificación del citoplasma no sólo es un efecto de las bajas temperaturas, sino que también podría actuar como una señal mediadora de otras respuestas celulares. Asimismo, apoyando esta última hipótesis, hay que tener en cuenta el retraso concomitante de la acumulación de ácidos orgánicos (Maldonado *et al.*, 2004) y de los cambios en el patrón de defensa de las enzimas quitinasa en chirimoyas conservadas a 6°C y pretratadas con altas concentraciones de CO₂ (Fig. 21).

Aunque la explicación a la funcionalidad de algunas proteínas PR en las respuestas celulares al estrés por bajas temperaturas permanece sin dilucidar, diferentes autores han hipotetizado con que tanto la infección por fitopatógenos como la exposición a las bajas temperaturas inducen procesos bioquímicos que llevan a la modificación de la pared celular (Griffith y Brown, 1982; Collinge *et al.* 1993; Rajashekar y Lafta, 1996). El desarrollo de estos eventos podría implicar la participación de las quitinasas en base a sus propiedades catalíticas y especificidades de sustrato. Así, tanto la actividad enzimática de las isoenzimas AChi24 y AChi26 como su potencial carácter extracelular podrían hacer de estas proteínas unos potenciales candidatos en la modificación de la pared celular del mesocarpo de la chirimoya durante el estrés por bajas temperaturas. Esta hipótesis se apoyaría en la existencia de sustratos endógenos para esta clase de enzimas en las células de las plantas (Benhamou y Asselin, 1989; van Hengel *et al.*, 2001; van Hengel *et al.*, 2002). En esta misma línea, las peculiaridades del comportamiento catalítico de AChi26, con una marcada actividad 1,4- β -(N)-acetilhexosaminidasa, nos permiten hipotetizar con una nueva funcionalidad no ligada a la defensa de la chirimoya durante su maduración. En distintas especies de plantas, una elevada actividad 1,4- β -(N)-acetilhexosaminidasa en el contexto de la maduración de un fruto ha sido ligada a un proceso de desglicosilación de glicoproteínas unidas a monómeros de NAG. La acción de esta clase de enzimas provocaría la liberación de N-glicanos, los cuales han demostrado su implicación en la estimulación de la maduración del tomate (Priem *et al.*, 1993; Jagadeesh *et al.*, 2002; Jagadeesh *et al.*, 2004). No obstante, el hecho de que la isoenzima AChi26 pueda actuar adicionalmente como un generador de elicitors durante el proceso de maduración de la chirimoya, no la excluye de su potencialidad en la constitución de un sistema de defensa profiláctico.

Por último, indicar que puesto que las especies de plantas tropicales y subtropicales se encuentran continuamente expuestas a un conjunto de estreses de origen abiótico como intensa radiación UV, elevadas temperaturas o presión osmótica, sería esperable que las proteínas PR derivadas de estas especies exhibieran características únicas respecto a las procedentes de otras plantas (Li *et al.*, 2003; Taira *et al.*, 2005a; Taira *et al.*, 2005b). Así, en este contexto, resulta menos sorprendente tanto la moderada robustez a las condiciones externas de las isoenzimas AChi24 y AChi26 como su significativa actividad hidrolítica y antifúngica *in vitro*. Teniendo en cuenta todas

estas propiedades, se abre la posibilidad de que ambas isoenzimas quitinasa sean empleadas en diferentes aplicaciones agronómicas e industriales. En el primer caso, su utilización estaría centrada en la construcción de plantas transgénicas con el objeto de incrementar la resistencia frente a hongos fitopatógenos e insectos (Broglie *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1996; Tabei *et al.*, 1998; Lawrence y Novak, 2006). Por otro lado, es muy conocido el interés de la farmacología en el uso de estas enzimas como productoras de quitooligosacáridos y NAG, dadas sus propiedades antitumorales y antiinflamatorias (Friedman y Shekan, 1980; Suzuki *et al.*, 1986; Towheed *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2009). En este sentido, la obtención de un oligómero de una longitud de cadena específica puede regularse de un modo sencillo estableciendo diferentes combinaciones de quitinasas con endo y exo-mecanismos (Aloise *et al.*, 1996). Sin embargo, si buscamos que estas estrategias sean rentables económicamente es absolutamente necesaria la superación de una serie de etapas como el aislamiento y clonaje del ADNc que codifica las isoenzimas AChi24 y AChi26 o la expresión de los transgenes en la planta de interés. Por ello, estos aspectos forman actualmente parte de futuras líneas de investigación en nuestro grupo.

3.- Caracterización de una isoenzima quitinasa ácida adaptada al frío como parte de una respuesta inicial de proteínas PR frente a un estrés por conservación a bajas temperaturas: inducción de AChi48

Los resultados de este trabajo nos han permitido constatar de un modo bastante preciso la existencia de una correlación entre las dos fases diferenciadas de los cambios en la actividad quitinasa y el perfil de isoenzimas PR-Q, y la frontera de irreversibilidad en el desarrollo de los síntomas del daño por frío. De este modo, la transición en la preponderancia de la actividad quitinasa entre las fracciones ácida y básica o en la inducción diferencial de isoenzimas quitinasa ácidas o básicas se situaría en el quinto día de conservación a 6 °C. Por otro lado, y aunque existe una fuerte influencia de los factores pre-recolección en el momento exacto del comienzo de los daños irreversibles, atendiendo a la época de recolección de esta variedad de chirimoya (diciembre, recogida tardía) asumimos que un periodo de conservación a 6 °C mayor que 6 días conduce irremediabilmente al desarrollo de una serie de procesos degradativos y de síntomas visibles de daño por frío en el mesocarpio de la chirimoya (Alique *et al.*, 1994; Alique y Zamorano, 2000; Muñoz, 2000). Curiosamente, es en plena interfase entre la fase reversible e irreversible del daño por frío cuando se observa el inicio de la inducción diferencial de una nueva isoenzima quitinasa con una relativamente alta masa molecular (AChi48). En este sentido, existen varios factores que hacen que el estudio detallado acerca de sus características y potencial funcionalidad resulte sumamente interesante en el contexto de un metabolismo fuertemente disfuncional por el efecto de las bajas temperaturas. Por ejemplo, llama la atención el hecho de que la inducción de la isoenzima AChi48 no sea simultánea a la de las otras dos isoenzimas quitinasa ácidas (AChi24 y AChi26). Por otro lado, aunque el comienzo de una acumulación significativa de AChi48 coincida con moderados niveles de AChi26 tras 5 días a 6 °C, el perfil resultante es radicalmente diferente si lo comparamos con los respectivos de AChi24 y AChi26, persistiendo e incluso aumentando sus niveles de inducción durante todo el proceso de conservación. En base a todos estos hechos, parece lógico establecer una comparativa entre las propiedades de AChi48 y las de las isoenzimas AChi24 y AChi26.

El proceso de purificación de la isoenzima AChi48 resultó relativamente sencillo, puesto que se logró aislar una fracción homogénea durante el desarrollo del mismo protocolo de aislamiento de la isoenzima AChi24, obteniendo una cantidad apreciable de la misma (0,92 mg por kilo de mesocarpio de chirimoya). Aunque el rendimiento de esta purificación fue ligeramente menor que el obtenido para las otras dos isoenzimas quitinasa ácidas (AChi24 y AChi26), éste sigue estando dentro de los encontrados en otras purificaciones similares (Lam *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Ho y Ng, 2007).

En lo que respecta a la identificación de la isoenzima AChi48 mediante EM, nos encontramos ante el mismo problema que el observado para la isoenzima AChi24. Esto es, se hizo necesaria la secuenciación *de novo* de alguno de sus péptidos hidrolizados por la acción de la tripsina, ya que los datos obtenidos de los diferentes espectros de fragmentación no dieron ningún resultado positivo tras su búsqueda en las bases de datos. Tras interpretar los espectros de

masas y obtener la secuencia de tres de sus péptidos, los resultados de las búsquedas de similitud con FASTS mostraron que dos de los péptidos pudieron asociarse significativamente a dos regiones altamente conservada del dominio catalítico del producto parcial de la traducción de un ARNm que codifica una quitinasa de clase I de *Capsicum annuum* (Fig. 42). Al igual que en el caso de AChi24, el bajo *E-value* obtenido para la isoenzima AChi48 indica el alto grado de similitud entre las secuencias analizadas y las identificadas, asemejándose al valor descrito en estudios similares (Samyn *et al.*, 2006; Samyn *et al.*, 2007; Tannu y Hemby, 2007; Hatano y Hamada, 2008).

La identificación de las isoenzimas AChi24 y AChi48 mediante la aplicación de una combinación de la secuenciación *de novo* de sus péptidos y la búsqueda de similitud de secuencia reafirma la utilidad de este tipo de análisis en especies de plantas donde la información acerca de su secuencia es reducida. En este sentido, el algoritmo FASTS requiere únicamente entre 15 y 20 residuos dispuestos en tres o cuatro péptidos para identificar robustamente homólogos que alcancen un 50 % o más de la identidad de la secuencia de la proteína a estudio. Estas condiciones permiten la identificación de aquellas proteínas altamente conservadas presentes en especies que no se encuentren estrechamente relacionadas con alguna de las plantas que presentan un genoma secuenciado (Mackey *et al.*, 2002; Liska y Shevchenko, 2003; Sunyaev *et al.*, 2003). Esta afirmación queda más patente si analizamos el árbol filogenético elaborado con la secuencias del gen *18S* ARNr de la chirimoya y de una gran parte de los organismos vegetales cuyo genoma está totalmente secuenciado o en una fase avanzada de desarrollo (*Anexo III*). La utilización de este marcador mitocondrial es un componente clave en el desarrollo de estudios filogenéticos debido a su alta tasa de mutación, herencia materna y falta de recombinación (Avise, 2000; Avise, 2004). Un examen detallado de los resultados mostró que la posición de *Annona cherimola* da lugar a un clado independiente, sin el acompañamiento de otros taxones, y estando únicamente enlazado con la raíz del árbol. Este análisis apunta en la dirección marcada por otros autores en estudios taxonómicos clásicos con caracteres morfológicos y fisiológicos (Heywood, 1993) o en recientes análisis filogenéticos con conjuntos de datos moleculares (Sauquet *et al.*, 2003). Así, la chirimoya estaría englobada en uno de los linajes más importantes (*Magnoliales*) que dieron lugar a la primera propagación de las angiospermas en la Tierra, mostrando una serie de rasgos morfológicos ancestrales que las sitúa en el complejo ranaliano. Se puede concluir por tanto, que la utilización de esta metodología de secuenciación *de novo* para la identificación de proteínas nos puede proporcionar un análisis inmediato, rápido y efectivo del proteoma de muchas especies de plantas sin esperar a la obtención de la secuencia de sus genomas.

Por otro lado, la obtención de una serie de características bioquímicas de la isoenzima AChi48 nos permitieron especular con su posible pertenencia a la clase Ib de las quitinasas de plantas. Entre ellas nos encontramos con su especificidad de unión ante una matriz de quitina regenerada observada durante su proceso de purificación, la cual sólo puede ser atribuida a la presencia de, al menos, un dominio CBD. Como se ha indicado anteriormente, las quitinasas de clase I poseen dos zonas de unión a la quitina: el dominio catalítico y una región situada en el extremo N-terminal semejante a la heveina (dominio CBD) (Iseli *et al.*, 1993; Yamagami y Funatsu, 1996; Taira *et al.*, 2005a; Taira *et al.*, 2005b). Asimismo, su *pI* fuertemente ácido indicaría

que la localización intracelular de la isoenzima AChi48 se sitúa *a priori* en el apoplasto del mesocarpo, lo cual es característico de las quitinasas de clase Ib (Van Damme *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1994; Inui *et al.*, 1996). Además, su elevada masa molecular la descartarían como una quitinasa de clase II o IV, puesto que éstas suelen tener un menor tamaño debido a la ausencia del dominio CBD o a delecciones en el dominio catalítico (Neuhaus, 1999). Por otro lado, el alto valor de este último parámetro físico de la isoenzima AChi48 es infrecuente. Dado que casi todas las quitinasas procedentes de plantas presentan una masa molecular que oscila entre 25 y 35 kDa (Collinge *et al.*, 1993; Graham y Stickelen, 1994; Neuhaus, 1999), son escasos los ejemplos de quitinasas purificadas que muestren valores superiores a los descritos en este rango (Sahai y Manocha, 1993; Radhajealakshmi *et al.*, 2000). Sin embargo, resulta llamativo que en varios de estos casos se observe la presencia de glicosilaciones en la estructura o la duplicidad del dominio CBD (Nielsen *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 2004; Taira *et al.*, 2005a; Kitajima *et al.*, 2010).

En lo que respecta a la influencia del pH y temperatura sobre la actividad hidrolítica de la isoenzima AChi48, los resultados de este trabajo revelan que su pH óptimo (5,5) presenta un valor intermedio a los descritos para las otras dos isoenzimas quitinasa ácidas (AChi24 y AChi26). Asimismo, aunque su rango de actuación efectivo (3-6,5) sea entre 1 y 2,5 unidades de pH inferior que los determinados para AChi26 y AChi24 respectivamente, éste se encuentra dentro del intervalo descrito para un gran número de quitinasas de plantas (Pegg, 1988; Lin *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1996a; Andersen *et al.*, 1997; Krishnaveni *et al.*, 1999; Baek *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003; Fernandez-Caballero *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). No obstante, la isoenzima AChi48 mostró una temperatura óptima (35 °C) significativamente menor que la observada en sus equivalentes ácidas de chirimoya o en otros ejemplos de la bibliografía (Vogelsang y Barz, 1993; Hung *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Troung *et al.*, 2003; Taira *et al.*, 2005a; Taira *et al.*, 2005b; Fernandez-Caballero *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Así, únicamente se ha encontrado este comportamiento en la actividad hidrolítica de una endoquitinasa de arroz (Baek *et al.*, 2001) y en una quitinasa recombinante de clase IV de papaya (Chen *et al.*, 2007). Sin embargo, el mayor punto de divergencia se ubica en la alta actividad quitinolítica de esta isoenzima a bajas temperaturas, un aspecto atípico en quitinasas de plantas. Así, mientras que AChi48 mantiene cerca de un 50 % de la actividad máxima a 5 °C, el resto de enzimas quitinasa purificadas en este trabajo retienen únicamente entre un 10 y un 30 % de la actividad máxima (Fig. 47 y 48). En este sentido, estas características resultan similares a las descritas para una quitinasa de clase I de uva de mesa, la cual muestra una significativa actividad hidrolítica a temperaturas por debajo de 0 °C (Fernandez-Caballero *et al.*, 2009).

Una de las consecuencias más conocidas de la exposición de un organismo a las bajas temperaturas es la fuerte inhibición de las tasas de las reacciones químicas catalizadas por enzimas. Esta fuerte dependencia con la temperatura se describe comúnmente con la ecuación de Arrhenius (Arrhenius, 1889), en donde se observa como las velocidades de reacción cambian exponencialmente con la temperatura. Por ejemplo, las velocidades de reacción de una enzima mesofílica pueden llegar a reducirse entre 16 y 81 veces al descender la temperatura del medio desde 37 °C hasta 0 °C (Lonhienne *et al.*, 2000). Ante estas condiciones externas, los organismos

han desarrollado una serie de herramientas enzimáticas para mantener unos niveles metabólicos compatibles con la vida. Entre ellos encontramos un incremento de la concentración de enzima que compense estas bajas velocidades de reacción. Sin embargo, esta estrategia es costosa en términos energéticos y sólo se ha detectado en pocos casos (Crawford y Powers, 1992). Otra alternativa implica la síntesis de las denominadas enzimas adaptadas al frío (*cold-adapted enzymes*), enzimas activas en frío (*cold-active enzymes*) o enzimas psicrófilas. Éstas exhiben actividades específicas hasta diez veces superiores que sus homologas mesofílicas cuando catalizan una reacción enzimática a bajas temperaturas. Así, un pequeño cambio en la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente en un homeotermo puede implicar pocos efectos en su metabolismo. Sin embargo, la naturaleza de las plantas es la de organismos ectotermos estacionarios que crecen en un amplio intervalo de temperaturas; y la presencia de este tipo de enzimas con modificaciones en sus propiedades térmicas puede involucrar una diferencia fundamental en su capacidad de adaptación. Los resultados descritos para AChi48 encajan en esta última posibilidad, presentando propiedades insólitamente semejantes a las descritas para quitinasas purificadas de bacterias psicrófilas, con un metabolismo adaptado a un rango de temperaturas entre 0 y 20 °C (Fenice *et al.*, 1998; Lonhienne *et al.*, 2001a). Pero no sólo es la elevada actividad específica de AChi48 a 5 °C la que nos lleva a esta observación (con valores de la k_{cat} a esta temperatura entre 3 y 7 veces mayores que el resto de isoenzimas quitinasa purificadas; Tabla 22). A esta característica le acompañan otras dos: por un lado, el hecho de que el descenso en la k_{cat} al pasar de 5 °C a 37 °C sea únicamente de 1,5 veces, y por el otro, el pequeño valor de la E_a de su reacción enzimática. Esto último es especialmente patente si se compara la magnitud de este parámetro termodinámico (6,56 kJ mol⁻¹) con el valor observado para otras quitinasas de plantas, la cual oscila en un rango entre 13,8 y 40 kJ mol⁻¹ (Boller *et al.*, 1988; Iseli *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1996; Kuo *et al.*, 2008). En resumen, la suma de todos estos parámetros sugieren que la isoenzima AChi48 exhibe varias de las propiedades que definen a las enzimas adaptadas al frío aisladas habitualmente de microorganismos psicrófilos (Lonhienne *et al.*, 2000; Feller, 2003). Curiosamente, varias de estas enzimas están clasificadas dentro de algunas de las familias de las glicosil hidrolasas. Entre ellas se incluyen una α -amilasa mutada de *Sus scrofa* (D'Amico *et al.*, 2004), una xilanasa de la bacteria antártica *Pseudoalteromonas haloplanktis* (Collins *et al.*, 2002; Collins *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2005), una 1,3- β -glucanasa de *Fibrobacter succinogenes* S85 (Iyo y Forsberg, 1999), una α -galactosidasa de *Carnobacterium piscicola* (Coombs y Brenchley, 2001), una quitinasa GH18 y una quitobiasa de la bacteria antártica *Arthrobacter* sp. TAD20 (Lonhienne *et al.*, 2001a; Lonhienne *et al.*, 2001b).o varias isoenzimas 1,3- β -glucanasa procedentes de hojas de *Secale cereale* (Yaish *et al.*, 2006).

No obstante, aunque la mayor actividad específica a bajas temperaturas es una de las principales adaptaciones fisiológicas de las enzimas activas en frío (Feller y Gerday, 2003), esta característica no puede considerarse un rasgo universal. Por ello, y con el objeto de profundizar en la elucidación de este aspecto en la catálisis, resulta especialmente revelador establecer una comparación de las variaciones de los parámetros termodinámicos de activación con otras quitinasas de plantas ante un sustrato similar y en iguales condiciones de reacción. Sin embargo,

mientras que varios de los parámetros termodinámicos de activación (ΔH^\ddagger , ΔG^\ddagger y ΔS^\ddagger) han sido ampliamente descritos en quitinasas GH18 y quitobiasas GH20 bacterianas psicrófilas (Lonhienne *et al.*, 2001a; Lonhienne *et al.*, 2001b), no hemos encontrado en la bibliografía estimaciones semejantes para estas enzimas en plantas. Por ello, como se puede observar en la Tabla 23, hemos optado por realizar estudios comparativos entre la isoenzima AChi48 y el resto de isoenzimas quitinasas purificadas en este trabajo. Este análisis mostró que AChi48 estaba caracterizada por una menor magnitud de $\Delta(\Delta G^\ddagger)$ cuando era comparada con el resto de isoenzimas. Sin embargo, este valor negativo de $\Delta(\Delta G^\ddagger)$ presentó una pequeña cuantía, lo cual estuvo causado por las grandes diferencias existentes entre las contribuciones entálpicas $\Delta(\Delta H^\ddagger)$ y entrópicas $\Delta(\Delta S^\ddagger)$. Esta compensación entálpica-entrópica calca a la perfección las características termodinámicas de todas las enzimas activas a las bajas temperaturas estudiadas hasta el momento. Por un lado, exhiben unos valores negativos del parámetro $\Delta(\Delta H^\ddagger)$ cuando son comparadas con sus homologas mesófilas. Este descenso de la magnitud de la entalpía de activación lleva a una reducción de la termodependencia de la k_{cat} y, consecuentemente, del efecto deletéreo de las bajas temperaturas en la velocidad de la reacción catalizada por la enzima. Por tanto, se puede considerar la reducción de la entalpía de activación en las reacciones catalizadas por enzimas psicrófilas como su principal parámetro adaptativo a las bajas temperaturas. La disminución en la energía de activación está relacionada estructuralmente con un menor número de interacciones entálpicas que deben romperse para alcanzar el estado activado del complejo enzima-sustrato (ES^\ddagger), sugiriendo una mayor flexibilidad estructural en el entorno del sitio catalítico. De este modo, la flexibilidad de toda la estructura molecular de la enzima o de determinadas regiones, compensaría en cierto modo la baja energía térmica proporcionada a bajas temperaturas. A lo largo de esta última década, datos experimentales han confirmado este concepto de ‘flexibilidad localizada’ en enzimas con funcionalidades muy dispares, como α -amilasa, ADN-ligasa, xilanasas, quitobiasas, β -lactamasa o LDH (Fields y Somero, 1998; Lonhienne *et al.*, 2001b; Collins *et al.*, 2003; D’Amico *et al.*, 2003; Georlette *et al.*, 2003; Michaux *et al.*, 2008). Pero por otro lado, este aumento en la flexibilidad explicaría el valor negativo del parámetro $\Delta(\Delta S^\ddagger)$ cuando son comparadas con sus homologas mesófilas. Así, como consecuencia de una mayor plasticidad estructural, el estado basal del complejo ES^\ddagger ocupa una distribución más ancha de estados conformacionales y la entropía de activación de este estado aumenta (siempre comparada con sus homologas mesófilas), dando como resultado una $\Delta(\Delta S^\ddagger) < 0$ (Fields y Somero, 1998). Por tanto, hay que considerar que una $\Delta(\Delta S^\ddagger) < 0$ se encuentra inherentemente asociado a una $\Delta(\Delta H^\ddagger) < 0$, y que por tanto se trata de un contra-efecto ligado a la adquisición de una alta actividad específica a bajas temperaturas por parte de esta clase de enzimas.

Por otro lado, la quitinasa purificada AChi48 presentó una termoestabilidad marcadamente menor que las isoenzimas AChi26 y AChi24, comenzando a perder su actividad hidrolítica a unas temperaturas entre 10 y 15°C inferiores que las detectadas para las otras dos quitinasas ácidas. Asimismo, mientras las isoenzimas AChi26 y AChi24 fueron estables en un rango de pH amplio tras ser incubadas durante una hora a temperaturas moderadas, el comportamiento de la isoenzima AChi48 fue diferente, manteniendo su estabilidad en un

intervalo mucho más estrecho, entre 3 y 7 unidades (Fig. 44B y 47B). Igualmente, otras quitinasas de plantas pusieron de manifiesto la baja estabilidad relativa de AChi48 a valores de pH moderados o elevadas temperaturas (Otha *et al.*, 1995; Yamagami *et al.*, 1997; Shih *et al.*, 2001; Li *et al.* 2003; Taira *et al.*, 2005a; Taira *et al.*, 2005b; Devavratha y Lalitha; 2008). En este sentido, esta menor estabilidad de la isoenzima AChi48 ante diferentes condiciones fisicoquímicas entronca con la mayor termosensibilidad de las enzimas psicrófilas comparada con sus homologas mesófilas y termófilas. Asimismo, esta relativa inestabilidad termal, añadida a su baja resistencia a la acción de agentes desnaturalizantes y la alta propensión al desplegamiento de la estructura terciaria a temperaturas moderadas (Ushakov, 1964; Georlette *et al.*, 2004), se ubica en el mencionado incremento local o global de la flexibilidad estructural (Feller *et al.*, 1999; Benthair *et al.*, 2000). Sin embargo, aunque la conexión entre flexibilidad y estabilidad resulta sumamente intuitiva, debe probarse experimentalmente mediante la realización del estudio de la estabilidad conformacional de la isoenzima AChi48. Así, será objeto de investigaciones futuras la determinación de la relación existente entre estructura, actividad, estabilidad y flexibilidad de esta quitinasa adaptada al frío.

Aunque la inducción de la isoenzima AChi48 se haya producido únicamente en frutos conservados a bajas temperaturas tras un periodo relativamente prolongado de tiempo, resulta algo paradójica la aparición de esta inusual herramienta en el acervo enzimológico de un organismo que no ha evolucionado en las mismas condiciones naturales que otros organismos psicrófilos y que, por tanto, no exhibe el efecto de la temperatura como una presión fuertemente selectiva en el establecimiento de una conformación más o menos flexible para la proteína. En este sentido, resulta interesante señalar los ejemplos expuestos por Georlette *et al.* (2003), en los cuales determinadas enzimas pueden encontrar numerosas presiones selectivas no relacionadas con la adaptación termal y que las dirigen a una elevada actividad específica a bajas temperaturas. Pero por otro lado, la existencia de enzimas adaptadas al frío también ha sido probada en algunos organismos mesófilos como en bacterias (Iyo y Forsberg, 1999; Zimmer *et al.*, 2006; Soror *et al.*, 2007) o plantas (Yaish *et al.*, 2006). En este sentido, la inducción de una enzima adaptada al frío en un organismo mesófilo podría atribuirse a tres hipótesis no necesariamente excluyentes. La primera establece que la presencia de estas enzimas se trataría de un fenómeno más general de lo que se ha teorizado, presentando una ventaja adaptativa no asociada necesariamente a las temperaturas de crecimiento de un organismo psicrófilo. Esta ventaja consistiría en exhibir unas velocidades de reacción prácticamente independientes de la temperatura, sin la necesidad de superar una elevada barrera energética (E_a), reduciéndose entonces el intervalo de tiempo existente entre el contacto de la enzima y el sustrato y la producción de la reacción catalizada. Salvando las distancias, emularía parcialmente las características descritas para las denominadas enzimas súper-eficientes o perfectamente evolucionadas, las cuales presentan una velocidad de reacción controlada únicamente por la difusión (Feller y Gerday, 1997; Stroppolo *et al.*, 2001). La segunda hipótesis implicaría que el gen que codifica la enzima adaptada al frío se haya originado por una transferencia genética horizontal (HGT, *horizontal gene transfer*) con un microorganismo psicrófilo. No obstante, la

identificación de la isoenzima AChi48 con una quitinasa GH19 hace que esta posibilidad sea bastante remota, dado que esta familia de quitinasas se ha encontrado casi exclusivamente en plantas. Y aunque recientemente se han descubierto las primeras quitinasas GH19 en bacterias, la hipótesis más aceptada actualmente asume que la aparición de estas enzimas en procariotas se debe a una HGT desde la planta y no al revés (Watanabe *et al.*, 1999; Hoell *et al.*, 2006; Udaya Prakash *et al.*, 2010). Por último, y de acuerdo a la hipótesis defendida por Iyo y Forsberg (1999), cabe la posibilidad de que el gen que codifica la isoenzima AChi48 represente un gen vestigial que no ha evolucionado completamente. Estos autores argumentan esta última hipótesis en base al origen marino de la bacteria mesófila a estudio, lugar donde existen unas condiciones constantes de bajas temperaturas. En este sentido, aunque existe una cierta controversia sobre el origen de la chirimoya, la mayoría de la literatura clásica (Fouqué, 1972; Ochse *et al.*, 1974; Popenoe, 1974) sitúa su área inicial de procedencia en los valles andinos de Perú, Chile y Ecuador, a unas altitudes entre 1600 y 2200 m. Por tanto, esta especie se encontraría adaptada en su forma salvaje a unas zonas con un régimen estacional clásico (otoño, invierno, primavera y verano), donde el invierno es una estación fría y seca y el verano es calido y húmedo. Y aunque la chirimoya es un fruto sensible a las heladas y temperaturas menores a -2 °C puede dañar seriamente su árbol, es una especie que puede soportar bajas temperaturas y entrar en periodo de latencia (Farré y Hermoso, 1997). Curiosamente las variedades comerciales de chirimoya cultivadas en zonas tropicales y subtropicales se desarrollan en un rango de temperaturas muy pequeño con pocas oscilaciones estacionales. Por ejemplo, en el caso de España las temperaturas medias globales (años 1996-2009) en las zonas de cultivo oscilan entre 25°C en verano y 13°C en invierno. No obstante, hay que tener en cuenta que la temperatura mínima media anual se sitúa en los 7,7 °C y que en el periodo de estudio se han registrado temperaturas mínimas absolutas de 3,6 °C (Rivas-Martínez y Rivas-Sáenz, 1996-2009). En base a todos estos datos, la posibilidad de la presencia de un gen vestigial que codifique una enzima adaptada al frío en chirimoya no parece tan clara como el caso estudiado por Iyo y Forsberg (1999). No obstante, la comprobación de esta hipótesis requiere más información al respecto. En este sentido, y puesto que las variedades silvestres de chirimoya presentan una mayor diversidad genética que las variedades comerciales (Narváez-Trujillo *et al.*, 2007), una primera serie de experimentos podría consistir en la búsqueda de la isoenzima AChi48 en frutos de variedades comerciales y silvestres durante su conservación a 6 °C y en diferentes tejidos del chirimoyo durante los meses más fríos mediante la realización de un patrón isoenzimático de quitinasas.

Por otro lado, y del mismo modo que otras proteínas PR adaptadas al frío (Yaish *et al.*, 2006), nos cuestionamos si es posible que las peculiares características de la actividad hidrolítica de la isoenzima AChi48 frente a la temperatura estuviesen ligadas con algún tipo de actividad anticongelante. No obstante, en lo que respecta a su habilidad potencial para unirse a núcleos de hielo e inhibir la recristalización del hielo *in vitro*, señalar que todas las evidencias experimentales apuntan que la isoenzima AChi48 carece de dicha funcionalidad (Fig. 84 y 86). Aunque en los termogramas obtenidos en presencia de agua ultrapura y tampón citrato sódico se observa una suave pendiente en la exoterma de formación de hielo, ésta no es debida tanto a una inhibición de

la recristalización del hielo especialmente lenta como a un conocido efecto inespecífico causado por la alta concentración de proteínas en soluciones hielo-agua (Knight *et al.* 1988). Por otro lado, es probable que el significado biológico de este fenómeno sea únicamente un mero epifenómeno derivado de la estructura de la isoenzima AChi48. En este sentido, en un trabajo publicado recientemente por nuestro grupo hemos observado un perfil similar para una quitinasa de clase I de uva de mesa (Fernandez-Caballero *et al.*, 2009). En este caso la elevada hidrofiliidad de esta enzima implicaría una significativa habilidad para asociarse mediante puentes de hidrogeno a moléculas de agua y hielo, provocando una lenta migración del límite de grano de los cristales de hielo y la obtención de una cinética de recristalización del hielo alterada (Knight *et al.*, 1988).

En la cinética global de la isoenzima AChi48 se advirtieron importantes diferencias, no sólo con las otras dos isoenzimas quitinasa ácidas inducidas a 6°C (AChi24 y AChi26), sino también con la isoenzima de baja masa molecular inducida en frutos tratados (BChi14), asemejándose su comportamiento al encontrado para la isoenzima BChi33. Así, el perfil curvado de la representación de Hanes-Wolf contrasta con el ajuste lineal de las curva de velocidad de las otras isoenzimas quitinasa (Fig. 57-59). Aunque las desviaciones del comportamiento Michaeliano pueden explicarse a través de diferentes causas como la presencia de múltiples isoenzimas en la mezcla de reacción o la inhibición por parte del sustrato, la convexidad de la representación derivada apunta a la existencia de algún tipo de mecanismo cooperativo en la enzima. Como ya se apunta en el apartado de *Resultados*, una explicación posible para las atípicas observaciones en la cinética enzimática de la isoenzima AChi48 se hallaría en que ésta muestre una cooperatividad positiva frente a los sustratos ensayados. De hecho, los cálculos realizados para medir la cuantía de esta cooperatividad dieron como resultado un discreto pero significativo valor del coeficiente de Hill mayor que 1 (Tabla 17). Este valor contrasta con la falta de sigmoicidad de la representación cinética directa. Sin embargo, hay que tener en cuenta que aunque la presencia de este perfil sólo es posible en un mecanismo cooperativo, dicho mecanismo no tiene por qué generar necesariamente una curva sigmoide (Ricard y Cornish-Bowden, 1987). Por otro lado, aunque se ha observado un comportamiento alostérico en una quitinasa de la oruga *Manduca sexta* frente a quitina (Bade y Stinson, 1979), la isoenzima AChi48 es uno de los escasos ejemplos de una quitinasa con un mecanismo autorregulatorio, discrepando del consenso general que establece a las hidrolasas como enzimas relativamente simples en lo que respecta a su comportamiento cinético (Zeffren y Hall, 1973; Koga *et al.*, 1999). No obstante, aunque se han propuesto varios modelos para explicar las cinéticas cooperativas de las enzimas, la mayoría de ellos se centran en las interacciones entre subunidades de enzimas oligoméricas. En este sentido, los escasos ejemplos de quitinasas con más de un dominio catalítico se circunscriben a enzimas purificadas de procariotas (Tanaka *et al.*, 2001; Howard *et al.*, 2004) e insectos (Royer *et al.*, 2002), presentando todas ellas una elevada masa molecular (130-320 kDa) y clasificándose dentro de la familia 18 de las glicosil hidrolasas. En el caso de la familia GH19, solamente se ha observado la existencia de una organización estructural más compleja de lo habitual en algunas quitinasas en las cuales el dominio CBD se encontraba presente por duplicado (Lerner y Raikhel, 1992; Zhao y Chye, 1999), no encontrándose la presencia de más de un dominio catalítico. Así, aunque se trate

de una idea atractiva y novedosa, la hipótesis de AChi48 como una enzima con más de un sitio de catálisis no puede tenerse en cuenta si atendemos al valor de su masa molecular, su naturaleza monomérica o a su identificación por EM con una quitinasa GH19.

Por otro lado, tradicionalmente se han postulado los modelos de cooperatividad enzimática considerando que la unión del sustrato se producía en condiciones de equilibrio (Monod *et al.*, 1965; Koshland *et al.*, 1966). Sin embargo, no hay que olvidar que ambos modelos no son modelos cinéticos, sino que los aspectos puramente cinéticos se han añadido *a posteriori*, asumiendo que lo que se observa como un experimento cinético refleja lo que se observaría si se pudiese medir la unión del sustrato en el equilibrio. Puesto que las condiciones en las que se producen las reacciones enzimáticas a nivel fisiológico son de no-equilibrio, distintos autores han ampliado el concepto de cooperatividad enzimática durante el desarrollo de este escenario. Así, se puede definir la cooperatividad cinética como la cooperación en el espacio de diferentes sitios catalíticos o como la cooperación en el tiempo de diferentes conformaciones de la misma enzima (Cornish-Bowden y Cardenas, 1987; Ricard y Cornish-Bowden, 1987). Esta definición asume que la enzima es una entidad flexible y que puede existir bajo varios estados conformacionales durante el ciclo de catálisis. En este sentido, si la isomerización de estos estados conformacionales se produce dentro de una escala de tiempo que no sea muy inferior a la de las otras reacciones, incluso una enzima monomérica con un único sitio de catálisis puede mostrar cooperatividad cinética (Ricard *et al.*, 1974; Neet, 1980). Puesto que la utilización del coeficiente de Hill clásico (h) no permite una correcta evaluación de la cooperatividad cinética (Ricard *et al.*, 1974), se optó por calcular el valor del coeficiente cinético de Hill extremo (h_{ext}) y del parámetro Γ de la isoenzima AChi48 mediante la aplicación de los modelos de cooperatividad cinética para enzimas monoméricas. Así, se encontró que su actividad enzimática mostraba una significativa cooperatividad positiva frente a los sustratos CM-Chitin-RBV, 4-MU- β -(GlcNAc)₂ y 4-MU- β -(GlcNAc)₃. La cooperatividad positiva monomérica se trata de un fenómeno relativamente raro y solo se ha observado en algunas enzimas como una ribonucleasa trifosfato reductasa (Beck, 1967; Panagou *et al.*, 1972), una ribonucleasa I (Walker *et al.*, 1975; Walker *et al.*, 1976), una glucoquinasa (Storer y Cornish-Bowden, 1976; Heredia *et al.*, 2006) o en una fenilalanina hidroxilasa adaptada al frío (Leiros *et al.*, 2007). Por otro lado, han sido propuestos dos modelos por los cuales puede transcurrir esta cooperatividad cinética en enzimas monoméricas: el modelo nemotécnico o de enzima con efecto memoria (Ricard *et al.*, 1974) y el modelo de transición lenta (Ainsle *et al.*, 1972). Aunque ambos modelos están basados en la existencia de diferentes estados conformacionales de la enzima, mientras en el primero se postula la existencia de dos estados distintos en equilibrio, en el segundo se asume la existencia de dos estados que se interconvierten a velocidades considerablemente bajas si las comparamos con la velocidad de la reacción catalizada (Fig. 87). No obstante, con los datos experimentales de este trabajo no hemos podido elucidar el mecanismo autorregulatorio de la isoenzima AChi48 o la caracterización de sus estados conformacionales.

La hidrólisis de los quitoooligosacáridos sintéticos por parte de la isoenzima AChi48 sugiere que su mecanismo de hidrólisis es diferente al observado en las otras endoquitinasas

purificadas desde el mesocarpo de chirimoya (AChi24, BChi33 y BChi14). Así, tanto por la capacidad de degradar el disacárido y el trisacárido fluorogénico como por las velocidades de estas reacciones enzimáticas ($k_{\text{cat}} [4\text{MU-}\beta\text{-(GlcNAc)}_2] > k_{\text{cat}} [4\text{MU-}\beta\text{-(GlcNAc)}_3]$) se pudo concluir que esta isoenzima mostraba propiedades intermedias entre una quitobiosidasa y una endoquitinasa. Quitobiosidasa, en lo que respecta a su considerablemente mayor efectividad en la degradación del disacárido que del trisacárido; y endoquitinasa, en lo que concierne a su capacidad de degradación del trisacárido generando el producto fluorescente (Robbins *et al.*, 1988; Harman *et al.*, 1993; Sahai y Manocha, 1993; Ren *et al.*, 2000). Sin embargo, y tal y como hemos indicado en el apartado 8.2.1 de los *Resultados*, esta falta de especificidad por uno u otro mecanismo puede estar originada por el carácter sintético de los sustratos utilizados. En este sentido, la caracterización cinética de una endoquitinasa purificada de boniato mostró como la velocidad de hidrólisis del sustrato artificial *p*NP-(GlcNAc)₂ fue casi el doble que la descrita para el quitooligosacárido natural (GlcNAc)₃ (Koga *et al.*, 1989). Por tanto, hay que tener en cuenta que la probabilidad de hidrólisis de los sustratos que presentan un sustituyente no glucídico, como el grupo 4-MU o *p*NP, puede ser modificada con respecto a la observada en sus equivalentes naturales (Robbins, 1988; Patil *et al.*, 2000). No obstante, esta ausencia de especificidad absoluta de la isoenzima AChi48 frente a sustratos ligados al grupo 4-MU no tiene por qué comprometer su clasificación. Si atendemos al ratio de las constantes catalíticas de la degradación del disacárido frente a la del trisacárido (2,27-4,09), podemos constatar como su magnitud es considerablemente superior a 1. Aunque no alcanzó los valores descritos por Robbins *et al.* (1988) para quitobiosidasas bacterianas, éstos son lo suficientemente significativos como para afirmar que la isoenzima AChi48 presenta el exomecanismo de una quitobiosidasa frente a estos sustratos fluorogénicos (Tabla 19).

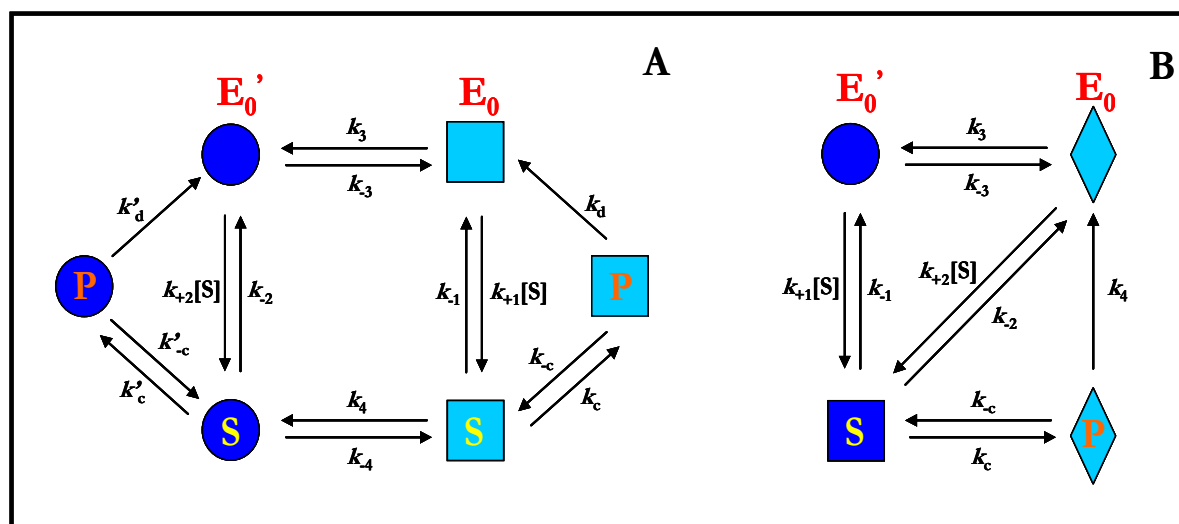


Figura 87.- Esquema de los modelos de cooperatividad cinética para enzimas monoméricas frente a un sustrato. (A) Modelo de transición lenta. En éste la enzima se dispone únicamente en dos estados conformacionales de la enzima (E_0 y E_0') en equilibrio, no existiendo una reacción de interconversión entre la enzima y el producto. (B) Modelo nemotécnico. Asume que el proceso de catálisis se desarrolla mediante el concepto del encaje inducido (Koshland, 1970), donde sólo una geometría del sitio activo (E_0) es capaz de desarrollar la catálisis. La ‘memoria’ de la enzima alude a que el producto estabiliza uno de los estados conformacionales de la enzima.

Los parámetros cinéticos de isoenzima AChi48 obtenidos frente a los sustratos asociados al grupo 4-MU nos permitieron obtener nuevas evidencias a favor de algunas hipótesis formuladas anteriormente a lo largo de este trabajo (Tabla 16). Por ejemplo, los superiores valores de la K_m de AChi48 si son comparados con los de la isoenzima AChi26 remarcen el escaso influjo del dominio CBD sobre la afinidad frente a quitooligosacáridos de pequeño tamaño. Por otro lado, el comportamiento catalítico de AChi48 frente a una baja cantidad de sustrato implicó una inferior afinidad y una elevada velocidad de catálisis, mostrándose el caso opuesto cuando aumentaba la concentración de sustrato en la mezcla de reacción. En este sentido, la propia cooperatividad cinética de AChi48 explicaría que se observen estas diferencias, ya que los cambios estructurales asociados a los dos hipotéticos estados conformacionales de esta isoenzima afectarían notablemente a sus propiedades catalíticas. No obstante, estas variaciones no estuvieron completamente compensadas, provocando que el valor de la k_{cat} tuviese una menor influencia sobre la eficiencia catalítica de la enzima. En resumen, la isoenzima AChi48 se mostró más eficiente catalíticamente ante elevadas concentraciones de todos los sustratos ensayados, sugiriendo que el mecanismo autorregulatorio de AChi48 afecta más a su afinidad por el sustrato que a su tasa de hidrólisis. Por otra parte, aunque obviamente existieron diferencias en las constantes cinéticas frente a 4MU- β -(GlcNAc)₃ entre AChi48 y las otras dos isoenzimas ácidas, sus valores fueron cercanos a los de AChi26 y, por tanto, se pueden extrapolar las conclusiones llegadas al comparar estos parámetros con los descritos en otros ejemplos de la bibliografía (Hollis *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2003). En otras palabras, la isoenzima AChi48 mostró una eficiencia catalítica considerablemente superior a la descrita en otras quitinasas de plantas, situando su potencial hidrolítico *in vitro* frente a este trisacárido sintético en un punto intermedio entre AChi24 y AChi26.

Al observar los valores de los parámetros cinéticos de la isoenzima AChi48 frente a CM-Chitin-RBV encontramos que la variación en la afinidad a diferentes concentraciones de sustrato se comportó de un modo análogo al detectado para los sustratos fluorogénicos. Por un lado, mientras que ante bajas cantidades de sustrato ($< 0,15 \text{ mg mL}^{-1}$) el valor de la K_m fue considerablemente elevado, un aumento de la concentración del sustrato provocó un fuerte descenso de la K_m (Tabla 16). Anteriormente hemos relacionado la elevada afinidad de AChi24 con la presencia potencial del dominio CBD en su estructura. Puesto que AChi48 posee probablemente dicho dominio, no resultan extrañas las analogías observadas entre las isoenzimas AChi24 y AChi48, situándose la cooperatividad cinética como un factor regulador en el comportamiento catalítico de la enzima. Por otro lado, aunque el dominio CBD incrementa la concentración local de sustrato en zonas próximas al centro catalítico de la enzima, hay que considerar también la influencia de las características del propio dominio catalítico o el mecanismo de hidrólisis sobre la afinidad de estas enzimas. Así, la caracterización de una endoquitinasa y una quitobiosidasa purificadas de plántulas de melón mostró que la primera enzima exhibía una mayor afinidad por la quitina y quitooligosacáridos de alto DP que la segunda (Roby y Esquerré-Tugaye, 1987). En este sentido, una explicación probable del mayor valor de la K_m de AChi48 a altas concentraciones de CM-Chitin-RBV frente al encontrado para AChi24

podría situarse en los diferentes mecanismos de hidrólisis deducidos para estas isoenzimas en el apartado 7.2.1 de los *Resultados*. En todo caso, los niveles de afinidad de AChi48 frente a CM-Chitin-RBV se hallaron también dentro del intervalo observado para otras quitinasas de plantas frente a glicol-quitina (Graham y Sticklen, 1994; Hung *et al.*, 2002; Truong *et al.*, 2003). Por otro lado, aunque las diferencias estuvieron más atenuadas, el mayor valor de la constante de especificidad (k_{cat}/K_m) de AChi48 con respecto a la otra isoenzima purificada con un exomecanismo (AChi26) en los dos rangos de concentraciones estudiados reflejan la trascendencia del dominio CBD en la eficiencia catalítica de las quitinasas frente a esta clase de polímeros.

Con el objeto de examinar el posible sinergismo asociado a la utilización conjunta de enzimas quitinasa con exomecanismos de hidrólisis diferentes sobre la degradación de un derivado de quitina, se optó por cuantificar la hidrólisis de CM-Chitin-RBV con combinaciones 1:1 de las isoenzimas AChi26 y AChi48. Los resultados mostrados en la Figura 70 indican la presencia de un moderado efecto sinérgico entre AChi26 y AChi48 y ratifican que ambas isoenzimas atacan por diferentes sitios del sustrato polimérico. Así, estos resultados podrían ser diseccionados del siguiente modo: el tratamiento de CM-Chitin-RBV con AChi48 (o AChi26) provocaría una hidrólisis inmediata sobre los sitios preferentes de degradación de esta enzima (en este caso liberando dímeros de diacetilquitobiosa). Al añadir la isoenzima AChi26 (o AChi48 si la primera enzima fuese AChi26) a la mezcla de reacción, ésta hidrolizaría tanto los productos generados como aquellos potenciales sitios no accesibles para AChi48. Asimismo, la acción de AChi26 podría generar nuevos puntos de hidrólisis para AChi48. No obstante, la acción sinérgica de esta combinación de quitinasas fue significativamente menor que la encontraba para la mezcla AChi24 + AChi26 durante las etapas iniciales de la reacción (Tabla 21). Así, todo demuestra que una hidrólisis exo+endo de CM-Chitin-RBV es más efectiva en la generación de pequeños fragmentos que permanecen solubles tras la adición de HCl. Sin entrar en las propiedades cinéticas de cada enzima en particular, la principal razón que atribuimos para explicar este hecho se origina en la fragmentación aleatoria de los enlaces internos del sustrato por parte de la endoquitinasa AChi24, lo cual generaría más productos detectables por reacción de hidrólisis que si la degradación se produjese únicamente desde el extremo no reductor.

Se procedió a evaluar el efecto inhibitorio de la isoenzima AChi48 sobre el crecimiento del micelio de *B. cinerea* en placa de PDA. Aunque esta enzima presentó una significativa actividad antifúngica, su valor fue considerablemente menor que el descrito para las isoenzimas AChi24 y AChi26 (Fig. 77 y Tabla 25). En este sentido, distintos autores han reflejado que las quitobiosidasas bacterianas muestran una menor actividad antifúngica *in vitro* que las endoquitinasas (Lorito *et al.*, 1993; Mavromatis *et al.*, 2003). Por otro lado, es significativo el mayor valor de inhibición del crecimiento del micelio de AChi26 con respecto a AChi48. *A priori*, el resultado debería ser el opuesto por dos variables: a) ambas isoenzimas están caracterizadas por poseer un exo-mecanismo de hidrólisis, b) la isoenzima AChi48 posee el dominio CBD en su estructura. Estos resultados suscitan intrigantes cuestiones acerca de cómo y por qué se desarrolla la resistencia o la susceptibilidad de los hongos frente a diferentes enzimas quitinolíticas. En este

sentido, el elevado efecto sinérgico (Fig. 78 y Tabla 26) en la inhibición del crecimiento de *B. Cinerea* al utilizar una combinación 1:1 de las isoenzimas AChi26 y AChi48 constató que además de existir algún tipo de complementariedad en los mecanismos degradativos, se podía descartar la presencia de alguna clase de inhibidor específico por parte del hongo que disminuya el rendimiento antifúngico de la isoenzima AChi48 (Sakuda *et al.*, 1986; Hodge *et al.*, 1996). Por tanto, los resultados actuales sugieren que son las propiedades intrínsecas de las isoenzimas AChi26 y AChi48 en el medio de reacción de la placa PDA los que explican su mayor o menor potencial antifúngico *in vitro* de AChi26 sobre AChi48.

Aunque en un estudio reciente se ha detectado la presencia de dos quitobiosidasas de 50 y 60 kDa (Libantová *et al.*, 2008) en diferentes tejidos de plantas sanas de *Drosera rotundifolia*, habitualmente se ha asociado la presencia de quitobiosidasas en plantas a una inducción provocada por la infección fúngica (Roby y Esquerré-Tugaye, 1987), en respuesta a la presencia de hongos patógenos (Hodge *et al.*, 1995) y no patógenos (Lahoz *et al.*, 2004), o al tratamiento con etileno (Kurosaki *et al.*, 1989). Por tanto, la significativa actividad quitobiosidasa detectada en la isoenzima AChi48 evoca cuestiones relativas del posible papel de este tipo de enzimas en la fisiología de frutos sometidos al estrés por bajas temperaturas. No obstante, teniendo en cuenta que el momento de su inducción coincide con moderados niveles de la isoenzima AChi26, la existencia de un sinergismo hidrolítico y antifúngico desarrollado *in vitro* entre AChi26 y AChi48 y que es muy factible que presente la misma localización subcelular que las isoenzimas AChi24 y AChi26, hacen probable que la acumulación de la isoenzima AChi48 pertenezca a la primera fase de defensa activa del mesocarpo de la chirimoya frente a las bajas temperaturas. Así, una respuesta inicial implicaría una inducción de las isoenzimas AChi24 y AChi26, activándose posteriormente la expresión de AChi48. Por otro lado, la prevalencia de su acumulación a lo largo de la conservación a bajas temperaturas podría estar fundamentada en su elevada actividad catalítica a bajas temperaturas. En este sentido, aunque la inducción de la isoenzima AChi48 no tiene por qué estar implicado necesariamente en la protección frente a un patógeno determinado, resulta interesante señalar que este factor diferencial de AChi48 podría proporcionar al mesocarpo de la chirimoya una serie de ventajas adicionales a la hora de evitar una infección en las actuales condiciones de conservación. Hay que tener en cuenta que periodos prolongados de conservación a 6 °C, donde los niveles de AChi48 son máximos, implican severos daños estructurales que pueden contribuir a un aumento de la susceptibilidad a la infección por fitopatógenos resistentes a las bajas temperaturas como *B. cinerea* (Fig. 11). Por otro lado, varios factores hacen pensar que las señales químicas responsables de la regulación de AChi48 son aparentemente diferentes de las que originan la inducción de las isoenzimas AChi24 y AChi26. Así, tanto el hecho de que se produzca una acumulación de la isoenzima AChi48 en chirimoyas pretratadas con altas concentraciones de CO₂ tras 5 días a 6 °C como el incremento de sus niveles de inducción durante la conservación prolongada en frío de frutos no tratados apuntan en esta dirección (Fig. 21).

Por último, resaltar las posibles aplicaciones biotecnológicas e industriales de la isoenzima AChi48 de acuerdo a sus inusuales propiedades catalíticas (solicitud de patente P200930266,

2009). Por un lado, su alto valor de la k_{cat} a 5 °C y los bajos valores de la E_a implican una alta efectividad de esta enzima en procesos de biocatálisis que requieran bajas temperaturas. En este sentido, una ventaja adicional de esta enzima hidrolítica es su fácil inactivación cuando fuese necesario, al ser suficiente con la aplicación de temperaturas moderadas o pH alcalinos. Asimismo, una vez clonado el gen que codifica esta enzima quitinasa, podría plantearse su utilización para prolongar el periodo de conservación a bajas temperaturas de cultivos de elevado interés económico.

4.- Cambios ultraestructurales y bioquímicos asociados a la conservación prolongada a bajas temperaturas. Correlación existente entre la inducción de BChl33 y el daño celular

Esencialmente existen dos formas por las cuales una célula puede morir. Una es el resultado de un daño traumático severo, como el originado en la exposición a altos niveles de un toxico o a la congelación, generado la muerte celular por necrosis. En contraste con esta muerte pasiva e indiscriminada, existe otra vía consistente en la activación de una ruta de suicidio codificada genéticamente denominada PCD. Su aparición puede ocurrir tanto en respuesta a un estrés de origen abiótico, durante la HR frente a un patógeno o a lo largo de las etapas finales del desarrollo de diferentes órganos de la planta. La PCD está caracterizada por un desmantelamiento controlado de la célula y requiere la implicación de una ruta de señalización dependiente de Ca^{+2} , la síntesis de compuestos ROS y la activación de una cascada de enzimas proteolíticas. Determinadas coincidencias estructurales y bioquímicas de estas respuestas con las observadas durante la exposición a bajas temperaturas (Stanley, 1991; Ishikawa, 1996; Yun *et al.*, 1996b; Wu *et al.*, 1997) permitieron lanzar la hipótesis de que el daño por frío en plantas se trataba de un proceso de senescencia inducida, donde la PCD se activaba en respuesta a este estrés. En este sentido, en la última década diferentes autores han agrupado y explicado todas las pruebas ultraestructurales y bioquímicas que demuestran la presencia del fenómeno PCD inducido por el frío. Asimismo, estos mismos autores han observado como este proceso comparte aspectos comunes con la PCD asociada a la senescencia o la ligada a la HR por ataque de patógenos (Kratsch y Wise, 2000; Evans, 2004; Gray, 2004; D'Angeli y Altamira, 2007).

En este sentido, y mediante la realización de experimentos con LT-SEM, pudimos caracterizar a nivel ultraestructural algunos de los cambios histológicos acontecidos en el mesocarpo de chirimoyas almacenadas durante 9 y 14 días a 6 °C. Así, la microestructura celular reveló una serie de cambios degradativos progresivos relacionados con la pérdida de compartimentalización celular. En este sentido, la destacada pérdida de la integridad de la membrana plasmática y el consiguiente desequilibrio en el intercambio de iones y metabolitos como consecuencia del estrés por frío, serían los causantes de la acumulación de material soluble en los espacios intercelulares (Fig. 11H). De un modo equivalente a los daños ultraestructurales causados por estrés osmótico (Gupta, 2007), se observaron síntomas de plasmolisis en forma de espacios entre la pared celular y la membrana plasmática. No obstante, otros autores han interpretado este fenómeno como una rigidificación de la membrana que envuelve a la célula por una transición de fase de sus fosfolípidos desde un estado líquido-cristalino a uno gel-sólido (Marangoni y Stanley, 1989; Sacandé *et al.*, 2001). Ambas explicaciones no son excluyentes y únicamente reflejan la aparición de daños por frío a nivel microscópico. Asimismo, todos estos resultados estuvieron en concordancia con los descritos anteriormente por otros autores en este fruto (Gutiérrez *et al.*, 1992). Concretamente, en este último estudio se constata mediante TEM que los primeros síntomas microscópicos del daño por frío sobrevienen como degradaciones en las membranas celulares y cloroplastos, concluyendo que las bajas temperaturas afectan

directamente a la organización de la membrana plasmática del mesocarpo de la chirimoya y, posiblemente, a su funcionalidad. Asimismo, estas observaciones coinciden con la usual sintomatología ultraestructural del daño por frío en diferentes tejidos de plantas (Marangoni, 1996; Kratsch y Wise, 2000). Por lo tanto, se puede concluir que una exposición prolongada del mesocarpo de la chirimoya en estas condiciones de temperatura lleva a daños celulares severos y a la consecuente expresión de los síntomas visibles del daño por frío. Por otro lado, estos resultados contrastaron con los cambios observados en la microestructura tras 3 días a 6 °C, sugiriendo que el daño celular causado por el frío parece originado más por los efectos acumulativos de las bajas temperaturas que por las consecuencias generadas por un corto evento de elevada intensidad.

Junto a las modificaciones en la ultraestructura celular, se estimó la evolución en el contenido de varios solutos compatibles. Concretamente, se determinó la presencia de azúcares y compuestos nitrogenados como potenciales indicadores de aquellos cambios metabólicos asociados a esta etapa del daño por frío. Los azúcares solubles juegan un importante papel crioprotector en las plantas durante el estrés por frío gracias a sus propiedades osmorreguladoras y estabilizadores de membranas y proteínas. En este sentido, diferentes ensayos en plantas y frutos han reflejado una relación entre los incrementos de las concentraciones de glucosa, fructosa o sacarosa y la adquisición de una cierta tolerancia al frío (King *et al.*, 1988; Olien y Clark, 1995; Palonen *et al.*, 2000). Asimismo, aunque el almidón no es un compuesto que entre dentro de la categoría de soluto osmoprotector, no existe ninguna duda de que este polisacárido de reserva es la fuente de los azúcares solubles en un gran número de tejidos de plantas sometidos a diferentes tipos de estrés (Nomura, 1995). Sin embargo, los resultados de este trabajo indicaron que los cambios en el metabolismo de los carbohidratos del mesocarpo de chirimoyas durante su conservación a 6 °C no mostraron implicación alguna en el desarrollo de mecanismos crioprotectores (Fig. 15 y 16). Por un lado, nos encontramos con la ausencia en los cromatogramas de azúcares asociados tradicionalmente a un aumento a la tolerancia a las bajas temperaturas como rafinosa o manitol (Bravo *et al.* 1997; Chiang *et al.* 2005). Por otro lado, aunque la hidrólisis del abundante almidón presente en el mesocarpo de chirimoyas recién recolectadas fue casi total, varios estudios han puesto de manifiesto que esta velocidad de degradación se encuentra inversamente relacionada con la temperatura de conservación, no detectándose la existencia de un mecanismo inductor específico por efecto del frío (Alique *et al.*, 1994; Gutiérrez *et al.*, 1994; Goñi *et al.*, 2008). Consecuentemente, la conservación a 6 °C únicamente retrasó los patrones de acumulación de glucosa, fructosa y sacarosa observados durante la corta maduración de este fruto a 20 °C. Curiosamente, a pesar de la extensión y severidad de los síntomas microscópicos de daño por frío en chirimoya tras más de 9 días a 6 °C, el fruto pudo alcanzar valores razonablemente elevados de sólidos solubles totales. Esto se explicaría en el hecho de que gran parte de las rutas metabólicas de la degradación del almidón no dependen tanto de la integridad de las membranas de los diferentes orgánulos como los amiloplastos, como de la presencia y actividad de un variado conjunto de enzimas citosólicas (Gutiérrez *et al.*, 1992; Sola *et al.*, 1994). No obstante, llama la atención la falta de correlación

existente entre los niveles de los azúcares solubles analizados y el pronunciado descenso de los niveles de almidón durante las primeras etapas de la conservación a bajas temperaturas. Especialmente, si se compara con los cambios descritos tras prolongados tiempos de conservación. Este hecho implica necesariamente la presencia de una vía metabólica fuertemente inducida por las bajas temperaturas y que hace disminuir la concentración total de estos compuestos. Una posible explicación se encuentra en la acumulación de ácidos orgánicos y disminución del pH citoplasmático en chirimoyas conservadas a bajas temperaturas (Muñoz *et al.*, 2001; Maldonado *et al.*, 2004). Así, estos resultados sugieren que los productos de la glicólisis de glucosa, fructosa y sacarosa pueden ser utilizados en la captura de CO₂ en el metabolismo de los ácidos dicarboxílicos-C₄ (Blanke, 1991), provocando en última instancia una mayor extensión del daño por frío (Yoshida *et al.*, 1999; Kawamura, 2008).

Por otro lado, las evidencias experimentales indicaron que otros parámetros bioquímicos asociados al metabolismo nitrogenado del fruto también reflejaron fuertes cambios de tendencia (Fig. 12, 14 y 18). Así, se produjo un incremento en los niveles de putrescina en las etapas finales del periodo de conservación a 6 °C. Es conocido que en plantas el metabolismo de poliaminas se modifica en respuesta a estreses bióticos y abióticos (Flores, 1991; Walters, 2003). Asociados a la respuestas de defensa se encuentra, entre otros, la síntesis de poliaminas conjugadas a compuestos fenólicos actuando como secuestradores de radicales libres o compuestos antifúngicos (Legaz *et al.*, 1998; Walters *et al.*, 2001). Por otro lado, la activación de las enzimas diamino y poliamino oxidasas, asociadas al catabolismo de poliaminas, inducen la acumulación de H₂O₂ (Walters, 2003). Este H₂O₂ producido puede ser utilizado por peroxidasas de la pared celular en la síntesis de lignina (Angelini *et al.*, 2008) y como señal iniciadora de la PCD (Levine *et al.*, 1994). Sin embargo, este incremento de la ruta de la degradación de las poliaminas se caracteriza por ser una etapa previa a la aparición de la respuesta de defensa. En chirimoya, donde los niveles de poliaminas conjugadas son mínimos y descienden durante la conservación a 6 °C (Escribano *et al.*, 1996), la disminución observada en el nivel de poliaminas totales durante la primera fase de defensa activa por efecto de las bajas temperaturas puede deberse al incremento en el catabolismo mediado por diamino y poliamino oxidasas. Además, el H₂O₂ producido podría estar asociado al incremento en la síntesis de lignina en la segunda fase del daño por frío (Maldonado *et al.*, 2002b) o relacionado con la inducción de las proteínas de defensa durante la conservación a 6 °C. Por otro lado, cabe destacar que a lo largo de segunda etapa de la conservación se produce un incremento de putrescina. Las poliaminas, al ser cationes polivalentes, están implicadas en la regulación del pH celular y en el mantenimiento de la homeostasis iónica y osmótica (Flores, 1991). En este sentido, este incremento en la concentración de poliaminas en chirimoya, principalmente putrescina, puede estar relacionado con la acidificación del pH celular o con la ruptura del balance osmótico por efecto de la degradación estructural inducida por un largo periodo de conservación a bajas temperaturas. En suma, y al igual que en otros frutos, los resultados parecen sugerir que la acumulación de putrescina podría ser un indicador metabólico del desarrollo del daño por frío en chirimoya (McDonald y Kushad, 1986; Wang y Ji, 1989; Nair y Singh, 2004).

Por otro lado, a pesar de la existencia de una fuerte correlación entre tolerancia al estrés y acumulación de prolina en plantas superiores, esta relación está lejos de ser universal. En concreto, existen estudios contradictorios sobre el papel de este osmolito en lo que respecta a su papel en la tolerancia a las bajas temperaturas. Por un lado se ha sugerido que el mayor contenido de prolina en plantas bajo estrés por frío actúa como un factor que confiere tolerancia a las bajas temperaturas (Flores *et al.*, 1988; Gong *et al.*, 1989; Chen *et al.* 1999; Feng, 2003). Por el otro, la acumulación de prolina también se ha considerado un síntoma de daño inducido por el estrés (Upadhyaya *et al.* 1989; Koster y Lynch, 1992; Ezz *et al.*, 2004). Si analizamos nuestros resultados teniendo en cuenta los datos sobre la ultraestructura, se puede inferir que el aumento en los niveles endógenos de prolina está más asociado al daño por frío que al desarrollo de un mecanismo de tolerancia. Asimismo, la reducción del contenido de proteína total y el aumento de la actividad proteolítica en el mesocarpo de chirimoyas durante el periodo de conservación a 6 °C (Montero *et al.*, 1995; Maldonado *et al.*, 2002a) se correlacionó de un modo más o menos exacto con el aumento en la concentración de prolina. Por tanto, una de las posibles causas de los cambios en este iminoácido pudo situarse en la mayor hidrólisis o en la inhibición de la síntesis de proteínas por efecto de las bajas temperaturas. En este sentido, Kim *et al.* (2004a) han demostrado que la rápida reducción en la síntesis *de novo* de proteínas en plantas bajo estrés hídrico está fuertemente relacionada con el incremento de la concentración de prolina. Asimismo, otros trabajos sugieren que la conservación a bajas temperaturas induce la degradación de las proteínas de la célula a través de la acción de proteasas inducidas específicamente en estas condiciones (Imin *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005; Gai *et al.*, 2008) o por el efecto de las ROS asociadas al estrés oxidativo generado por las bajas temperaturas (Hodges, 2003).

De acuerdo a los resultados mostrados arriba, la severidad del daño por frío indican un cierto desmantelamiento de las estructuras celulares y un descontrol de importantes parámetros bioquímicos en el mesocarpo de la chirimoya, anticipando una probable muerte celular. Teniendo en cuenta que la maduración de un fruto climatérico se puede describir también como un proceso senescente inducido y regulado por etileno (Fluhr y Matoo, 1996; Giovannoni, 2004; Matoo y Handa, 2004) y ROS (Qin *et al.*, 2009), la simultaneidad en la inducción de la isoenzima BChi33 o el incremento de la actividad 1,3- β -glucanasa y antifúngica *in vitro* en la fracción básica en la etapa final de la maduración de la chirimoya o de la conservación a 6 °C sugieren la existencia de un patrón funcional común para determinadas proteínas de defensa durante todos estos procesos. Asimismo, puesto que también es conocida la inducción de diferentes proteínas PR antimicrobianas básicas durante el desarrollo de la HR para proteger a la planta del ataque del patógeno (Stintzi *et al.*, 1993; Hammond-Kosack y Jones, 1996; Zhou *et al.*, 1997; Quirino *et al.*, 1999; Gepstein *et al.*, 2003), nos planteamos la posibilidad de la existencia de dicho patrón común a expensas de la presencia de una respuesta de resistencia frente a un patógeno. Por ello, y con el objeto de aportar algún tipo aclaración en este sentido, en las siguientes páginas se procederá a discutir detalladamente las características y funcionalidad de la isoenzima BChi33.

El aislamiento de una fracción homogénea de la isoenzima BChi33 se produjo desde el extracto básico de mesocarpo de chirimoyas conservadas durante 9 días a 6 °C y requirió la

combinación de dos etapas consecutivas de cromatoenfoque. A diferencia de las otras isoenzimas quitinasa purificadas en este trabajo, el rendimiento de este proceso fue sensiblemente superior, alcanzando una producción de 2,13 mg de proteína por kilo de tejido. Asimismo, si a este aspecto le sumamos el alto valor del grado de purificación alcanzado, nos encontramos con una de las estrategias de purificación de quitinasas en frutos con resultados más eficientes observadas en la bibliografía (Lam *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Ho y Ng, 2007).

Por otro lado, la isoenzima BChi33 mostró un valor de la masa molecular (33,0 kDa) muy similar al observado en otras quitinasas básicas de clase I (Vogelsang y Barz, 1993; Vannini *et al.*, 1999; Gijzen *et al.*, 2001; Taira *et al.*, 2005a; Taira *et al.*, 2005b). Además, si nos fijamos en los valores de movilidad electroforética en un medio reductor, podemos especular con la presencia de múltiples enlaces disulfuro en la forma nativa monomérica de BChi33 (Fig. 50). Siguiendo el razonamiento aplicado para la isoenzima AChi24, estos enlaces internos suelen observarse frecuentemente en el dominio CBD y en el dominio catalítico de las quitinasas GH19. Todos estos indicios previos fueron confirmados con éxito a través de la identificación inequívoca de la isoenzima BChi33 mediante PMF y fragmentación de péptidos mediante MALDI-TOF/TOF con el producto de la transcripción de un gen que codifica una endoquitinasa básica de clase Ib de *Castanea sativa*. En este caso, el análisis directo de los espectros de fragmentación de cinco péptidos de la isoenzima BChi33 mediante el programa MASCOT nos proporcionó identificaciones positivas, no requiriendo la utilización de la secuenciación *de novo*. No obstante, la determinación de la secuencia de dos péptidos adicionales mediante esta última técnica y la búsqueda de similitud consiguiente nos confirmó el resultado de esta identificación. Asimismo, la fiabilidad de esta identificación se asoció a dos factores adicionales. Por un lado, hay que tener en consideración el excepcionalmente bajo valor de significancia estadística obtenido (Mascot *score*: 350; *E-score*: $4,6 \cdot 10^{-29}$). Por el otro, señalar que las secuencias de los péptidos identificados significativamente cubrieron diferentes zonas del conservado dominio catalítico de las quitinasas GH19 (Fig. 41 y *Anexo II*). Aunque uno de los péptidos identificados mediante MASCOT se localizó en el extremo C-terminal de una quitinasa extracelular, la baja significancia estadística obtenida en esta búsqueda no nos permite extraer afirmaciones concluyentes acerca de la presencia o ausencia del dominio CTP en BChi33. Por tanto, en lo que respecta a su localización celular, el marcado carácter básico del pI (8,9) de la isoenzima BChi33 nos sugiere que se acumula probablemente en la vacuola de las células del mesocarpo de la chirimoya (Neuhaus, 1999). Por otro lado, y a título aclarativo, conviene destacar que aunque en la bibliografía se hayan descrito quitinasas de clase Ib levemente básicas (pI: 7,9), el valor de su punto isoeléctrico proviene de una predicción a partir de su secuencia y no de una determinación experimental (Allona *et al.*, 1996; Arie *et al.*, 2000).

Asimismo, aunque la actividad catalítica de la isoenzima BChi33 frente a diferentes valores de pH y temperatura mostró muchas similitudes con otras quitinasa purificadas, su rango de actuación efectivo se limitó a 60 °C, contrastando con el comportamiento de AChi24 y AChi26 (Fig. 45A y 48A). Por otro lado, características como un pH óptimo levemente ácido (5,5), valores significativos de actividad enzimática en medios moderadamente ácidos y básicos

(3-8) o una temperatura óptima de reacción de 37 °C hacen de BChi33 un ejemplo modelo dentro de las quitinasas de plantas y frutos (Pegg, 1988; Lin *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1996a; Andersen *et al.*, 1997; Krishnaveni *et al.*, 1999; Baek *et al.*, 2001; Hung *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Troung *et al.*, 2003; Taira *et al.*, 2005a; Taira *et al.*, 2005b; Fernandez-Caballero *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Anteriormente hemos afirmado que no es muy habitual encontrar quitinasas de plantas con una elevada termoestabilidad o resistencia a valores de pH extremos, y que los escasos ejemplos se observan en especies que crecen en climas tropicales o subtropicales (Li *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2004; Taira *et al.*, 2005a; Taira *et al.*, 2005b). En este sentido, la isoenzima BChi33, al igual que las isoenzimas AChi24 y AChi26, también se ajustó a estas características, reteniendo su actividad hidrolítica a altas temperaturas o a rangos de pH amplios durante un prolongado periodo de tiempo (Fig. 45B, 48B).

Tal y como hemos destacado antes, la representación de Hanes-Wolf de la isoenzima BChi33 para los diferentes sustratos no dio lugar a un ajuste lineal como en la mayor parte de isoenzimas quitinasa purificadas en este trabajo. Su perfil se asemejó al de la isoenzima AChi48, aunque la convexidad de las curvas de BChi33 en el intervalo de concentraciones ensayado resultó algo más marcada (Fig. 57-59). Aplicando el mismo razonamiento seguido para la isoenzima AChi48, solamente nos resta la cooperatividad positiva como el único modelo teórico que nos explique cualitativa y cuantitativamente estos resultados cinéticos (Fig. 87). Del mismo modo que AChi48, la posibilidad de más de un sitio de catálisis parece remota de acuerdo a su caracterización como una quitinasa de clase I monomérica. Si recordemos los antecedentes expuestos en la *Introducción* de este trabajo, este tipo de enzimas presentan un único dominio catalítico altamente conservado donde nunca se ha observado la presencia de más de un sitio de catálisis (Neuhaus, 1999). Por tanto, este hecho nos impide aplicar los modelos de cooperatividad exclusivos de enzimas oligoméricas (Monod *et al.*, 1965; Koshland *et al.*, 1966), inclinándonos por la utilización de las ecuaciones asociadas a la cooperatividad cinética para enzimas monoméricas (Ricard *et al.*, 1974; Neet, 1980). Así, la hidrólisis de los sustratos CM-Chitin-RBV, 4-MU- β -(GlcNAc)₂ y 4-MU- β -(GlcNAc)₃ por parte de la isoenzima BChi33 se caracterizó por una clara cooperatividad cinética positiva, tal y como se evidenció por la convexidad de las representaciones recíprocas (Fig. 63-65) y por un valor superior a 1 de los coeficientes h_{ext} (Tabla 17). Además la magnitud del coeficiente extremo de Hill nos permitió extraer dos conclusiones: 1) el mecanismo autorregulatorio de BChi33 está significativamente más acentuado para todos los sustratos utilizados que en el caso de AChi48, y 2) la extensión de la cooperación positiva entre los dos hipotéticos estados conformacionales de la enzima libre se encuentra relativamente próxima al máximo teórico (Ricard y Noat, 1985).

Por otro lado, los resultados cinéticos frente a CM-Chitin-RBV también mostraron como las constantes cinéticas de isoenzima BChi33 frente a este sustrato variaban enormemente en función de su concentración. Igualmente que para la isoenzima AChi48, el origen de este suceso se explicó por la cooperatividad positiva. Así, frente a concentraciones menores a 0,15 mg · mL⁻¹, el valor de la K_m de BChi33 fue el más elevado de todas las isoenzimas quitinasa caracterizadas en este trabajo. Es más, su nivel de afinidad se encontró significativamente por debajo de los

descritos de otras quitinasas de plantas frente a glicol quitina (Graham y Sticklen, 1994; Hung *et al.*, 2002; Truong *et al.*, 2003). Sin embargo, ante superiores concentraciones de CM-Chitin-RBV la afinidad de esta enzima aumento casi 9 veces y se equiparó a la calculada para AChi24 (Tabla 16). Tal y como se ha discutido para AChi24 y AChi48, es probable que la presencia del dominio CBD en la secuencia de la isoenzima BChi33 sea el factor determinante en una unión más fuerte del centro catalítico a CM-Chitin-RBV, lo cual derivó en una eficiencia catalítica significativamente elevada.

Al igual que en los otros ejemplos de quitinasas de este trabajo, la isoenzima BChi33 también demostró una falta de especificidad absoluta en la hidrólisis de los sustratos fluorogénicos, degradando tanto el disacárido como el trisacárido sintético. No obstante, y al contrario que la otra isoenzima cooperativa positiva (AChi48), el valor del ratio de las constantes catalíticas de la degradación del disacárido frente a la del trisacárido fue inferior a 1 (Tabla 19). Tomando todos estos datos en conjunto, podemos concluir que BChi33 mostraba una clara actividad endoquitinasa. Además de una preferencia por la hidrólisis del sustrato de mayor tamaño, los parámetros cinéticos de esta enzima frente a los quitoooligosacáridos asociados al grupo 4-MU reflejaron que esta enzima exhibía una k_{cat}/K_m frente al trisacárido 4MU- β -(GlcNAc)₃ muy superior a la encontrada para el resto de endoquitinasas de este trabajo (AChi24 y BChi14). Incluso a bajas concentraciones de sustrato la eficiencia catalítica de BChi33 fue muy parecida a la de AChi24. Asimismo, este comportamiento cinético no estuvo originado tanto en una mayor velocidad de hidrólisis como en la elevada afinidad por los sustratos fluorogénicos ante elevadas concentraciones de sustrato (Tabla 16). Anteriormente hemos demostrado que la importancia del dominio CBD sobre la afinidad de quitoooligosacaridos se encuentra diluida (Gill *et al.*, 1999; Arakane *et al.*, 2004), por lo que sólo podemos especular con la presencia de elementos o conformaciones estructurales específicas en el dominio catalítico de la isoenzima BChi33 que expliquen estas diferencias en los parámetros cinéticos. Por otro lado, estos resultados son coincidentes con los expuestos por Brunner *et al.* (1998), donde se describe como las quitinasas básicas de clase I de tabaco son las más efectivas en la degradación de grandes quitoooligosacáridos. En todo caso, las consecuencias prácticas de este comportamiento cinético implican que la isoenzima BChi33 se trata de una quitinasa con una gran capacidad hidrolítica frente a quitoooligosacáridos de GP 3 y 4, mostrando una actividad entre 400 y 4000 veces mayor que la descrita para otras endoquitinasas de plantas en las mismas condiciones experimentales (Hollis *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta las características de las quitinasas básicas de clase I (Neuhaus, 1999), es posible que BChi33 muestre también la capacidad de degradar la pared celular de las hifas de fitopatógenos. En este sentido, los ensayos de actividad antifúngica *in vitro* han demostrado que la isoenzima BChi33 inhibe significativamente el crecimiento del micelio de *B. cinerea*. Asimismo, las cantidades requeridas de enzima para obtener una actividad antifúngica apreciable se encontraron dentro del intervalo descrito para otras quitinasas (Salzman *et al.*, 1998; Ano *et al.*, 2003; Guan *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009), mostrando un potencial significativamente mayor que el de otra quitinasa básica de clase I purificada por nuestro grupo (Fernandez-Caballero *et al.*, 2009). No

obstante, si comparamos el efecto inhibitorio de BChi33 con el detectado para la isoenzimas AChi24 y AChi26, nos encontramos con que las dos quitinasas ácidas muestran una mayor actividad antifúngica *in vitro* (Tabla 25). En este sentido, aunque se ha afirmado que las quitinasas básicas vacuolares muestran un mayor efecto inhibitorio frente al crecimiento del micelio de diferentes hongos que sus homologas ácidas apoplásticas (Sela-Buurlage *et al.*, 1993; Vogelsang y Barz, 1993; Joosten *et al.*, 1995), nuestro caso parece ser una excepción a esta regla general. No obstante, hay que tener en cuenta la existencia de salvedades similares en otras familias de proteínas PR (Alexander *et al.*, 1993).

Asimismo, podemos constatar la existencia de una falta de concordancia entre los parámetros cinéticos de la hidrólisis de CM-Chitin-RBV y los valores de actividad antifúngica *in vitro*. Por ejemplo, una k_{cat}/K_m de BChi33 muy superior a la calculada para AChi26 o AChi48 contrasta con una similar o menor capacidad de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* (Tabla 16 y 25). Estos datos confirman lo sugerido por otros autores acerca de la inexistencia de una correlación directa entre la eficiencia catalítica frente a CM-Chitin-RBV y la actividad antifúngica *in vitro* (Vogelsang y Barz, 1993). Por tanto, es probable que el papel de las quitinasas frente al ‘esqueleto’ de quitina de la pared del hongo difiera de su acción hidrolítica *in vitro* y/o esté influenciada por diferentes factores que la potencien o inhiban. Así pues, los resultados obtenidos nos indican que la única aplicación de un ensayo de actividad hidrolítica frente a derivados solubles de quitina es insuficiente para extrapolar predicciones cuantitativas acerca de su actividad antifúngica.

Por otro lado, el potencial antifúngico de la isoenzima BChi33 se magnificó tras combinar esta proteína con un extracto enriquecido en isoenzimas 1,3- β -glucanasa básicas de chirimoya, reveló que estos dos tipos de enzimas actúan de un modo fuertemente sinérgico sobre la hifa del hongo. En este sentido, el coeficiente de sinergismo observado en esta mezcla se situó en valores cercanos a los descritos para las combinaciones más efectivas analizadas en este trabajo (AChi26 + AChi24 y AChi24 + AGluC), sugiriendo un modo complementario de hidrólisis entre ambas clases de enzimas. Esto último resulta más evidente si tenemos en cuenta que quitinasas y 1,3- β -glucanasas presentan diferentes objetivos estructurales en la pared celular del hongo y que una acción hidrolítica concertada se traduciría en una mayor eficacia degradativa sobre las células de *B. cinerea*. Por otro lado, y de acuerdo a los valores de masa molecular y pI, se puede inferir que el extracto utilizado esta formado por isoenzimas 1,3- β -glucanasa de clase I (Leubner-Metzger y Meins, 1999). En este sentido, los resultados obtenidos están en concordancia con los obtenidos para otras mezclas de quitinasas y 1,3- β -glucanasa de clase I ensayadas *in vitro* (Mauch *et al.*, 1988b, Sela-Buurlage *et al.*, 1993; Joosten *et al.*, 1995; Kim y Hwang, 1997; Anand *et al.*, 2004) e *in vivo* (Zhu *et al.*, 1994; Jongedijk *et al.*, 1995; Anand *et al.*, 2003).

Los datos aquí mostrados indican que una isoenzima quitinasa básica con una significativa actividad hidrolítica y antifúngica *in vitro* se induce en el mesocarpo de chirimoyas en las etapas finales de su conservación a 6 °C y maduración a 20 °C. Asimismo, revelan la existencia de un claro efecto sinérgico antifúngico con un conjunto de isoenzimas 1,3- β -glucanasas presentes a niveles apreciables y coincidentes en el tiempo con la acumulación de BChi33. Igualmente, el

mecanismo autorregulatorio de esta isoenzima podría conferirle al fruto una ventaja selectiva frente a los fitopatógenos, puesto que la interacción de BChi33 con las hifas del hongo se produce en un entorno caracterizado por una elevada concentración local de sustrato en zonas próximas a su centro catalítico. Sin embargo, todas estas propiedades se sitúan en el contexto de unos frutos aparentemente sanos y en los que no se han observado síntomas visibles de infección fúngica durante los 14 días de conservación. En este sentido, aunque hay poca información acerca de los problemas fitosanitarios durante la conservación de la chirimoya, todos los trabajos existentes coinciden en señalar la baja prevalencia de infecciones fúngicas en estos frutos conservados a bajas temperaturas. A modo de ejemplo, indicar que el porcentaje de daños habitual se sitúa en un intervalo que oscila entre el 10 y el 30 % tras más de 21 días de conservación (Reginato y Lizana, 1980; Marín, 1997; Cotroneo y Besoain, 1998; Pardo, 2001; Pentzke, 2006). Por otro lado, como hemos descrito anteriormente, la desorganización de las estructuras celulares y la hidrólisis de macromoléculas son procesos críticos y comunes que acontecen durante la PCD asociada al daño por frío severo y a la senescencia post-climatérica de un fruto. Por tanto, todo parece confirmar que la inducción coordinada de estos dos componentes de defensa activos en el mesocarpo del fruto (BChi33 y BGluC) está más relacionado con el desarrollo de diferentes procesos de muerte celular que a una infección por patógenos. En la misma línea se encuentran otros trabajos donde sugieren el papel activo de las quitinasas en la PCD (Passarinho *et al.*, 2001) o en la senescencia de la hoja (Hanfrey *et al.*, 1996; Obregón *et al.*, 2001). Asimismo, el hecho de que la isoenzima BChi33 no esté presente o que los niveles de las isoenzimas 1,3- β -glucanasa básicas desciendan tras 14 días a 6 °C, nos permite concretar que la isoenzima BChi33 serviría, no tanto como un indicador del daño celular en el mesocarpo de la chirimoya, sino como un marcador de cuando este daño comienza a producirse de forma significativa. En este sentido, si tenemos en cuenta que el tratamiento con altas concentraciones de CO₂ tiene un efecto evidente en el retraso de la maduración de la chirimoya (Alique, 1995; Del Cura *et al.*, 1996; Muñoz *et al.*, 1997) o en la disminución de los síntomas del daño por frío (Merodio *et al.*, 1998; Muñoz *et al.*, 1999; Maldonado *et al.*, 2002b; Maldonado *et al.*, 2004), la ausencia de BChi33 en el patrón de isoenzimático de los frutos tratados confirma esta última característica. Por último, aunque desconocemos el papel exacto de esta isoenzima en la fisiología del fruto, dada su insignificante actividad crioprotectora *in vitro* o su nula actividad AFP, es plausible asumir que contribuya junto a las isoenzimas 1,3- β -glucanasa básicas constitutivas en un aumento del potencial defensivo del fruto durante una etapa caracterizada por un dramático incremento de la susceptibilidad a patógenos necrotróficos.

5.- Mecanismos bioquímicos asociados al incremento de la tolerancia a las bajas temperaturas por la aplicación de un pretratamiento con altas concentraciones de CO₂

El estrés no es algo que únicamente deba ser combatido. El estrés es también una de las herramientas esenciales de la naturaleza e inteligentemente utilizado puede proporcionar varios aspectos beneficiosos sobre la fisiología de plantas y frutos. En este sentido, la aplicación de un estrés controlado en forma de una modificación de la atmósfera de conservación de frutos sensibles a las bajas temperaturas se ha revelado eficaz en la reducción de la intensidad de los síntomas del daño por frío (Bertolini *et al.*, 1991; Retamales *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1997; Pesis *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2004; Porat *et al.*, 2004a). Concretamente, el empleo de un tratamiento con altas concentraciones de CO₂ durante 3 días ha sido útil en la mejora de la calidad de chirimoyas conservadas a 6 °C a través de la regulación de su metabolismo fenólico o ácido (Maldonado *et al.*, 2002b; Maldonado *et al.*, 2004) o en la acumulación de GABA y poliaminas (Merodio *et al.*, 1998; Muñoz *et al.*, 1999).

En este trabajo hemos caracterizado las variaciones ultraestructurales acontecidas en el mesocarpo de chirimoyas tratadas con CO₂ y conservadas a 6 °C. Si establecemos una comparativa con las propiedades del mismo tejido de los frutos no tratados, llegamos a la conclusión de que el pretratamiento gaseoso tiene un claro efecto sobre la consolidación de la estructura celular y el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática. Estas afirmaciones están basadas en la ausencia de material soluble en los espacios intercelulares a lo largo de todo el periodo de conservación o la fuerte adhesión entre la pared celular y la membrana plasmática (Fig. 11I, K, L). En este sentido, todas estas evidencias experimentales reflejan también que el tratamiento con altas concentraciones de CO₂ mantiene un efecto residual persistente, observándose incluso diferencias significativas tras 14 días de conservación a 6 °C (Fig. 11H y N). Por otro lado, estos resultados fueron similares a los descritos por Pérez-Manuera *et al.* (2009a; 2009b) acerca de la disminución de los síntomas del daño por frío en caquis sometidos un tratamiento con 1-MCP.

Aunque los efectos beneficiosos del pretratamiento con altas concentraciones de CO₂ en el incremento de la tolerancia a las bajas temperaturas de la chirimoya son bien conocidos, no lo es tanto el papel potencial que puedan jugar los carbohidratos durante este proceso. En líneas generales, el tratamiento gaseoso implicó una menor hidrólisis de almidón evidenciada por la cuantificación mediante DSC o por las imágenes de la ultraestructura (Fig. 11 y 16). Consecuentemente, esta disminución en el aporte de carbono implicó una significativa disminución de las concentraciones de glucosa y fructosa a lo largo del periodo de conservación. Paradójicamente, la concentración de sacarosa se mantuvo en valores próximos a los detectados en los frutos no tratados (Fig. 15). Estos resultados estuvieron de acuerdo con lo descrito en otros frutos, donde la aplicación de tratamientos térmicos dirigidos al aumento de la tolerancia al frío implicó un mantenimiento de los niveles de sacarosa (Lingle y Dunlap, 1987; Holland *et al.*, 2002). Asimismo, de acuerdo a la bibliografía, podemos sugerir dos posibles hipótesis que

expliquen este fenómeno. Por un lado, es posible que las enzimas implicadas directamente en la síntesis de sacarosa desde glucosa y fructosa estén inducidas en respuesta al CO₂ (Holland *et al.*, 2005). Por el otro, algunos estudios han sugerido la activación de otras fuentes de carbono alternativas al almidón como potenciales sustratos de la síntesis de sacarosa (Vu *et al.*, 1995; Nagao *et al.*, 2005; Galli *et al.*, 2008). En todo caso, aunque la sacarosa pueda jugar un papel crioprotector durante la conservación a bajas temperaturas, los cambios en sus niveles fueron apenas relevantes con respecto a los descritos en los frutos dañados por el frío. Por tanto, podemos afirmar que en el mesocarpo de chirimoyas tratadas con CO₂ no existe una relación clara entre los niveles de carbohidratos y la tolerancia a las bajas temperaturas.

Además de los azúcares solubles, también se analizó la variación de otros osmolitos en los frutos tratados con CO₂ durante su conservación a 6 °C. En lo que respecta a las variaciones de prolina, el tratamiento gaseoso estuvo asociado con unos niveles estacionarios, sin diferencias significativas con los de los frutos recién recolectados (Fig. 14). En este sentido, se observó una tendencia similar en la concentración de proteínas totales (Maldonado *et al.*, 2002a). Estos resultados sugieren que la reducción de los síntomas del daño por frío en los frutos tratados tampoco estaría mediada por la actuación de la prolina. Aunque otro estudio en pomelos ha sugerido que los menores niveles de prolina en frutos tolerantes al frío puede asociarse a su utilización en la síntesis de proteínas estables a las bajas temperaturas (Ezz *et al.*, 2004), el mantenimiento de las concentraciones de proteínas parece descartar este punto. Por otro lado, esta ausencia de cambios en los niveles de prolina reafirma su papel como síntoma del daño por frío en los frutos no tratados. En lo que concierne a los cambios en los niveles de poliaminas, la presencia de mayores niveles de putrescina o el mantenimiento de los valores de espermidina por efecto del CO₂ podrían ser factores importantes en el desarrollo de la tolerancia a las bajas temperaturas durante los primeros días de conservación (Fig. 18). Asimismo, estos resultados son esencialmente coincidentes con otros experimentos similares realizados por nuestro grupo (Merodio *et al.*, 1998; Muñoz *et al.*, 1999). En este sentido, Maldonado *et al.* (2002a) sugieren que la coincidencia entre los menores valores de concentración de amonio y aminoácidos y el aumento de los niveles de poliaminas en chirimoyas pretratadas con CO₂ implica que este tratamiento post-recolección está activando el sistema de reasimilación de carbono y nitrógeno, manteniendo un metabolismo más equilibrado. Por otro lado, el descenso de la concentración de estos compuestos nitrogenados tras la transferencia al aire de los frutos tratados descartó algún tipo de efecto osmoprotector o estabilizador durante el resto del periodo de conservación a 6 °C.

Es un hecho bien conocido que la acumulación de glicina betaína en un amplio intervalo de especies de plantas se produce en respuesta a un estrés hídrico o salino (McCue y Hanson, 1990; Rhodes y Hanson, 1993; Xing y Rajashekar, 1999). Sin embargo, también se ha sido descrito el mismo fenómeno en respuesta a las bajas temperaturas durante el proceso de aclimatación al frío de trigo (Naidu *et al.*, 1991), centeno (Koster y Lynch, 1992), cebada (Kishitani *et al.*, 1994), fresa (Rajashekar *et al.*, 1999) o *A. thaliana* (Xing y Rajashekar, 2001). Así, el incremento de glicina betaína endógena en estas especies se produjo en un intervalo que osciló entre dos y cinco veces con respecto al valor de los controles. En este sentido, la acumulación de

glicina betaína detectada en el mesocarpo de chirimoyas pretratadas con CO₂ comenzó de un modo significativo después de la aplicación del tratamiento gaseoso, alcanzando valores casi cuatro veces superiores a los descritos en frutos no tratados tras 9 días a bajas temperaturas (Fig. 17). Por otro lado, aunque la concentración de glicina betaína fue significativamente menor que la de otras especies acumuladoras durante su aclimatación al frío (Koster y Lynch, 1992; Kishitani *et al.*, 1994), la variación de este compuesto en respuesta a la conservación a 6 °C se correlacionó con el incremento de la tolerancia a las bajas temperaturas. En este sentido, tras el pico máximo de glicina betaína, su concentración sufrió un brusco descenso que fue coincidente con una menor adhesión entre la pared celular y la membrana plasmática (Fig. 11N). No obstante, la concentración de este osmolito fue significativamente superior a las de los frutos no tratados tras 14 días, reafirmando la idea de un efecto residual del CO₂ una vez transcurridos largos periodos de conservación. Por último, en lo que respecta a su mecanismo crioprotector, las bajas concentraciones absolutas de glicina betaína descartarían a este compuesto como osmorregulador (Sakamoto y Murata, 2001; Quan *et al.*, 2004), sugiriendo una posible función estabilizadora de membranas a través de la inhibición de la peroxidación lipídica (Chen *et al.*, 2000) o previniendo la desnaturalización de proteínas mediante su actuación como chaperona química (Bourot *et al.*, 2000; Diamant *et al.*, 2001).

Además de los diferentes osmolitos que pueden contribuir a la adquisición de una mayor tolerancia a las bajas temperaturas, hay que destacar el papel jugado por varias proteínas inducidas por el frío con diversas funcionalidades crioprotectoras *in vitro* (Renaut *et al.*, 2006; y referencias asociadas). En este trabajo hemos demostrado que la cuantificación de la actividad LDH residual tras dos ciclos de congelación-descongelación (-196 °C/20 °C) en presencia de algunos extractos proteicos del mesocarpo de chirimoyas pretratadas con CO₂ implicó una significativa actividad crioprotectora *in vitro* (Fig. 79). Asimismo, la inducción de dos proteínas de baja masa molecular inmunoreconocidas con una quitinasa (BChi14) y una 1,3-β-glucanasa (AGlu19) coincidió con aquellas fracciones que se mostraron más activas, llegando a correlacionarse la intensidad de la banda de AGlu19 con la actividad crioprotectora (Fig. 80). Debido a todo esto, resulta evidente el interés en la purificación y caracterización en profundidad de BChi14 y AGlu19, intentando identificar su relación funcional con el incremento de la tolerancia a las bajas temperaturas.

La isoenzima BChi14 fue purificada homogéneamente a partir de la fracción básica obtenida del mesocarpo de chirimoyas pretratadas con CO₂ y conservadas 9 días a 6 °C mediante el uso de dos etapas consecutivas de cromatoenfoco. Por otro lado, aunque tanto el rendimiento (1,20 mg por kg de mesocarpo) como el factor de purificación obtenidos fueron inferiores a los obtenidos para el resto de isoenzimas quitinasa de este trabajo, no se apartaron demasiado de lo descrito en bibliografía (Lam *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Ho y Ng, 2007). En el caso de la isoenzima AGlu19, y de acuerdo a las características del patrón isoenzimático, se optó por la utilización de material procedente de frutos tratados y conservados 3 y 9 días a 6 °C. Así, se obtuvo también una purificación homogénea de una isoenzima ácida 1,3-β-glucanasa de baja masa molecular utilizando las mismas técnicas cromatográficas que en el caso de BChi14. Sin embargo, el fuerte descenso del rendimiento durante la etapa de ultrafiltración condicionó los

parámetros de esta purificación. De este modo, se obtuvieron cerca de 1,27 mg de proteína por kg de tejido con un factor de purificación moderado (17,76). Estos valores fueron significativamente menores que los encontrados en otros trabajos equivalentes (Hrmova y Fincher, 1993; Krebs y Grumet, 1993; Akiyama *et al.*, 1997; McCollum *et al.*, 1999; Peumans *et al.*, 2000; Dicko *et al.*, 2001).

Anteriormente hemos indicado varias razones que dificultan e, incluso, previenen la identificación de proteínas procedentes de especies poco representadas en las bases de datos. A estos factores hay que sumar la distribución en familias multigénicas que habitualmente conforman tanto quitinasas como 1,3- β -glucanasas (Leubner-Metzger y Meins, 1999; Neuhaus, 1999) o las propias limitaciones de las herramientas de búsqueda (van Wijk, 2001; Song *et al.*, 2007). Por todo ello, sólo una de las seis proteínas purificadas en este trabajo pudo identificarse de un modo inequívoco mediante la interpretación de los resultados de su PMF. Así, la isoenzima AGlu19 fue identificada con el producto de la traducción de *PR-Q'b*, un ARNm de una endo-1,3- β -glucanasa de clase III que se acumula en las hojas de planta de tomate durante una infección vírica (Domingo *et al.*, 1994). En este sentido, a pesar que la proteína predicha mostraba un carácter básico, ésta no presentaba el péptido glicosilado señal en el extremo C-terminal que la dirige a la vacuola. No obstante, de acuerdo a las secuencias de péptidos publicadas, se ha sugerido que una 1,3- β -glucanasa básica vacuolar aislada de hojas infectadas de planta de tomate presenta probablemente la misma estructura primaria que la teórica de *PR-Q'b* (van Kan *et al.*, 1992; Rep *et al.*, 2002). Por tanto, a falta de más evidencias experimentales acerca de la localización intracelular o de datos adicionales sobre la secuencia aminoacídica, no podemos concretar si la isoenzima AGlu19 se acumula en el apoplasto o en la vacuola del mesocarpo de las chirimoyas. En lo que concierne a la significancia estadística de esta identificación, remarcar que, aunque el valor del *score* no fue demasiado elevado, tanto su magnitud como los criterios de identificación se encontraron dentro de lo descrito en otros análisis proteómicos en plantas a través del PMF (Cui y Huang, 2005; Vasconcelos *et al.*, 2005; Hashimoto y Komatsu, 2007).

En el caso de la isoenzima BChi14, la combinación de los resultados del PMF con los obtenidos del espectro de uno de sus péptidos internos dio como resultado una identificación positiva y significativa estadísticamente con el polipéptido derivado de un gen inducido durante una infección fúngica y que codifica una endoquitinasa de clase Ib de trigo (Liao *et al.*, 1994). Debido a la escasa abundancia y/o baja ionización de los péptidos procedentes de BChi14, únicamente pudimos confirmar la secuencia de uno de ellos mediante EM/EM. No obstante, dicho péptido estuvo localizado en una región altamente conservada del dominio catalítico de varias quitinasas GH19 (*Anexo II*). Por otro lado, la estructura primaria de la proteína identificada predijo su localización extracelular en base a la ausencia del péptido CTP. En este sentido, aunque el valor de m/z de uno de los péptidos de BChi14 se corresponde con la del uno de los péptidos predichos de la proteína identificada situado en pleno extremo C-terminal ($m/z = 2654.1216$; *Anexo II*), la no ratificación de su secuencia mediante MASCOT nos hace ser cautos con respecto a la localización de BChi14 en la célula. Asimismo, hay que tener en cuenta que, *a priori*, el carácter básico de esta isoenzima ($pI = 8,26$) la ubicaría en la vacuola de la célula del

mesocarpo de la chirimoya. Por tanto, al igual que la isoenzima BChi33, los resultados actuales no son suficientes para establecer de un modo fiable su localización intracelular, requiriéndose la realización de experimentos adicionales.

Uno de los parámetros físico-químicos más inusuales de las isoenzimas BChi14 y AGlu19 es su baja masa molecular (Tabla 15 y *Anexo I*). Sobre todo si ésta es comparada con las de la mayoría de quitinasas y 1,3- β -glucanasas de plantas. Así, al analizar esta característica en un conjunto heterogéneo de quitinasas de plantas pertenecientes a la familia GH19, podemos observar como la masa molecular se sitúa en un intervalo entre 23 y 40 kDa (Mayer *et al.*, 1996a; Robinson *et al.*, 1997; Sowka *et al.*, 1998; Sanchez-Monge *et al.*, 1999; Taira *et al.*, 2005a; Taira *et al.*, 2005b; Huet *et al.*, 2006; Fernandez-Caballero *et al.*, 2009; Kikuchi *et al.*, 2009). En este sentido, la menor masa molecular de la isoenzima BChi14 podría estar originada en la presencia deleciones internas que impliquen un 50 % o más de la secuencia aminoacídica de las quitinasas GH19 estándar. No obstante, existen algunos ejemplos de quitinasas con bajos valores de masa molecular (10-22 kDa), de las cuales desconocemos su estructura primaria o la clase a la que pertenecen (Kurosaki *et al.*, 1988; Kurosaki *et al.*, 1989; Lin *et al.*, 1992; Hou *et al.*, 1998; Baek *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2001). Asimismo, a pesar de todo esto, resulta interesante remarcar que la isoenzima BChi14 y estos otros ejemplos de quitinasas de pequeño tamaño conservan una significativa actividad hidrolítica *in vitro*. Por otro lado, la situación de la isoenzima AGlu19 es similar, con la salvedad de que no hemos encontrado en la bibliografía ninguna enzima 1,3- β -glucanasa de plantas con una masa molecular inferior a 29 kDa (Hrmova y Fincher, 1993; Krebs *et al.*, 1993; Churngchow *et al.*, 1995; Akiyama *et al.*, 1997; Helleboid *et al.*, 1998; McCollum *et al.*, 1999; Morohashi y Matsushima, 2000; Peumans *et al.*, 2000; Dicko *et al.*, 2001; Subroto *et al.*, 2001; Velazhahan *et al.*, 2003; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2008). Puesto que esta isoenzima también está caracterizada por una actividad hidrolítica *in vitro* frente a laminarina, tanto BChi14 como AGlu19 se erigen como interesantes modelos en la caracterización de la estructura mínima de las proteínas GH17 y GH19 que permita una catálisis enzimática efectiva.

A diferencia del resto de quitinasas purificadas en este trabajo, la isoenzima BChi14 purificada reveló un pH óptimo neutro, mostrando un amplio intervalo de actividad efectiva distribuido entre condiciones moderadamente ácidas y básicas (Fig. 45). Como hemos remarcado en páginas anteriores, el pH óptimo de la mayoría de las quitinasas de plantas se encuentra en un estrecho intervalo ácido (Pegg, 1988; Lin *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1996a; Andersen *et al.*, 1997; Krishnaveni *et al.*, 1999; Baek *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003; Fernandez-Caballero *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). No obstante, no es inusual encontrar ejemplos de quitinasas procedentes de angiospermas tropicales cuyo máximo de actividad enzimática está localizado a valores de pH neutros o básicos (Taira *et al.*, 2005a; Taira *et al.*, 2005b; Chen *et al.*, 2007). Por otra parte, la actividad enzimática de la isoenzima AGlu19 frente a laminarina mostró un pH óptimo (5,0) coincidente con el de otras 1,3- β -glucanasas de plantas (Carrasco *et al.*, 1983; Hrmova y Fincher, 1993; Vogelsang y Barz, 1993; Akiyama *et al.*, 1997; Peumans *et al.*, 2000; Dicko *et al.*, 2001; Subroto *et al.*, 2001). Asimismo, el perfil en campana de la curva de valores de la actividad hidrolítica de AGlu19 frente al pH delineado en la Figura 46A nos sugirió que la

catálisis de esta enzima está mediada por dos aminoácidos con grupos ionizables como se ha observado en la estructura de 1,3- β -glucanasas de cebada (Chen *et al.*, 1993). En este sentido, puesto que los valores del pK_a de los residuos catalíticos implicados puede ser estimado a través de los valores de pH donde la actividad de la enzima equivale a un 50 % del máximo, el residuo nucleófilo y el residuo ácido donador de protones de AGlu19 tendrían un pK_a aproximado de 3 y 6, respectivamente. Estos valores son similares a los encontrados en una enzima 1,3- β -glucanasa básica de arroz (Akiyama *et al.*, 1997) y coinciden con los de los residuos de ácido glutámico responsables de la catálisis de otra enzima 1,3- β -glucanasa de cebada (Høj y Fincher, 1995).

Es un hecho que las diferentes isoenzimas quitinasa existentes en una misma especie muestran en ocasiones un amplio intervalo de temperaturas y pH óptimos de reacción, reflejando su diversidad funcional. En este sentido, la isoenzima BChi14 se caracterizó por una temperatura óptima menor que la descrita para la mayoría de quitinasas purificadas en este trabajo o que en otros ejemplos de la bibliografía (Vogelsang y Barz, 1993; Hung *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Troung *et al.*, 2003; Taira *et al.*, 2005a; Taira *et al.*, 2005b; Fernandez-Caballero *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). No obstante, a grandes rasgos, su comportamiento resultó parecido al observado para la isoenzima AChi48 (Fig. 47A y 48A). Asimismo, la baja termoestabilidad de BChi14 también asemejó más su comportamiento al de AChi48 (Fig. 47B y 48B). No obstante, conviene remarcar la existencia de una importante diferencia entre ambas isoenzimas. Así, BChi14 únicamente retuvo un 30 % de la actividad hidrolítica a 5 °C frente al 50 % detectado para AChi48. Todos estos factores (baja temperatura óptima de reacción, un porcentaje significativo de actividad hidrolítica a bajas temperaturas y una inferior termoestabilidad) sumados al razonamiento aplicado anteriormente al comportamiento de la isoenzima AChi48, nos podrían llevar a pensar que BChi14 comparte también las características canónicas de las enzimas adaptadas al frío. Sin embargo, un análisis exhaustivo de la comparativa de los parámetros termodinámicos de activación de la reacción de hidrólisis nos indicó que la compensación entálpica-entrópica detectada para la isoenzima AChi48 y otras enzimas adaptadas al frío no tiene lugar en el caso de BChi14. Así, el marcado desequilibrio entre los parámetros $\Delta(\Delta H^\ddagger)$ y $\Delta(\Delta S^\ddagger)$ tuvo como consecuencia un valor negativo de $\Delta(\Delta G^\ddagger)$ con respecto a AChi48, siendo similar este diferencial al resto de isoenzimas con carácter mesófilo (Tabla 23). Por tanto, aunque la isoenzima BChi14 mantenga una significativa actividad hidrolítica a bajas temperaturas, se puede descartar su carácter psicrófilico. En este sentido, si consideramos los dos efectos antagónicos (ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger) que definen la elevada actividad específica de una enzima adaptada al frío, resulta concebible asumir que para aumentar su k_{cat} el compromiso ideal pasa por establecer la máxima flexibilidad estructural permitida en regiones de la enzima implicadas en los cambios conformacionales asociados a la reacción catalítica. Adicionalmente, a este proceso se sumaría el mantenimiento o el aumento de la rigidez estructural en todas las áreas que no estén directamente relacionadas con el proceso catalítico. Sin embargo, si la adquisición de flexibilidad estructural se produjese también en regiones poco implicadas en los movimientos ligados a la catálisis, esta modificación no afectaría a la ΔH^\ddagger , disminuyendo por el contrario el valor de la ΔS^\ddagger y en última instancia la velocidad de reacción. De esta manera, y a falta de más evidencias experimentales sobre la

estabilidad estructural de la isoenzima BChi14, podemos encajar dentro de esta hipótesis una explicación a los valores de sus parámetros termodinámicos de activación.

Por otro lado, la máxima actividad hidrolítica *in vitro* para la isoenzima AGlu19 fue detectada a 40 °C, una temperatura inferior a la descrita para otras 1,3- β -glucanasas purificadas en plantas y frutos (Balance y Manners, 1978; Vogelsang y Barz, 1993; Akiyama *et al.*, 1997; McCollum *et al.*, 1999; Dicko *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2008). Sin embargo, ésta fue parecida a la encontrada en varias isoenzimas 1,3- β -glucanasa activas a bajas temperaturas (Yaish *et al.*, 2006). Asimismo, y coincidiendo con las enzimas de este último trabajo, la isoenzima AGlu19 conservó un significativo porcentaje de su actividad hidrolítica a 5 °C (Fig. 49A). No obstante, en la evaluación de los parámetros termodinámicos de activación de AGlu19 nos encontramos en la misma situación que la descrita para las isoenzimas quitinasa purificadas en este trabajo. Así, el único ejemplo de 1,3- β -glucanasas activas en frío procedentes de plantas carece de dato alguno acerca de la termodinámica de la reacción catalizada (Yaish *et al.*, 2006). No obstante, si atendemos a la caracterización de una 1,3- β -glucanasa bacteriana adaptada al frío (CelG), se constata como los valores de los parámetros E_a , ΔH^\ddagger , ΔG^\ddagger o ΔS^\ddagger son prácticamente idénticos (Iyo y Forsberg, 1999). Aunque el sustrato utilizado en este trabajo muestra ligeras diferencias con la laminarina, los resultados obtenidos con AGlu19 parecen indicar que, al igual que CelG, esta isoenzima exhibe una menor termodependencia de la k_{cat} . Además, y de un modo similar a los otros ejemplos de 1,3- β -glucanasas adaptadas al frío, AGlu19 mostró una baja estabilidad termal cuando fue expuesta a elevadas temperaturas (Fig. 49B). En este sentido, aunque la tinción con el reactivo de Schiff indicó que la isoenzima AGlu19 estaba glicosilada como otras 1,3- β -glucanasas de plantas (Kato *et al.*, 1973; Shinshi *et al.*, 1983; Kurosaki *et al.*, 1989; Hrmova *et al.*, 1993; Helleboid *et al.*, 1998; Subroto *et al.*, 2001), no existen sólidas evidencias que relacionen esta modificación post-traducciona con una mayor estabilidad de esta clase de enzimas ante condiciones extremas de pH y/o temperatura. Por tanto, todos estos datos nos permiten concluir provisionalmente que la isoenzima AGlu19 es un ejemplo más de una 1,3- β -glucanasa adaptada al frío procedente de un organismo mesófilo.

Tras el estudio del mecanismo de hidrólisis de las isoenzimas BChi14 y AGlu19 podemos afirmar sin lugar a dudas que ambas se caracterizan por una fragmentación aleatoria de sus respectivos sustratos. Así, en el caso de la quitinasa básica, los resultados experimentales frente a diferentes sustratos fluorogénicos fundamentan este mecanismo endohidrolítico (Tabla 16). En este sentido, BChi14 no liberó producto fluorescente alguno desde el monosacárido 4MU- β -GlcNAc y mostró una mayor velocidad relativa en la hidrólisis del sustrato de mayor grado de polimerización (Tabla 19). En todo caso, hay que volver a remarcar que en esta isoenzima también se detectó una falta de especificidad completa en la degradación de 4MU- β -(GlcNAc)₂ y 4MU- β -(GlcNAc)₃, reafirmando las argumentaciones hechas anteriormente acerca de la influencia del grupo fluoróforo (Robbins *et al.*, 1988). Por otro lado, la indistinta capacidad de hidrólisis de la isoenzima AGlu19 frente a laminarina oxidada o laminarina en estado nativo, la degradación fallida de PNPG o la completa ausencia de una inhibición significativa por parte de δ -gluconolactona reflejaron la incapacidad de esta enzima a la hora de eliminar residuos de

glucosa desde el extremo no reductor del polímero, justificando su clasificación como una 1,3- β -endoglucanasa (EC 3.2.1.39) (Tabla 20). Asimismo, esta característica coincide con la mayoría de 1,3- β -glucanasas de plantas y frutos estudiadas hasta la fecha (Hrmova *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1994; Churngchow *et al.*, 1995; Akiyama *et al.*, 1997; Morohashi y Matsushima, 2000; Dicko *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2008).

El análisis cinético de la isoenzima BChi14 nos indicó que esta quitinasa presentaba un potencial hidrolítico *in vitro* inferior que el resto de isoenzimas quitinasa purificadas en este trabajo. Si nos centramos en los experimentos realizados con el polímero CM-Chitin-RBV, aunque su afinidad por este sustrato se encontró en un nivel intermedio dentro del rango de K_m calculadas, el valor de k_{cat} fue entre 4 y 20 veces menor que el descrito para el resto de quitinasas de chirimoya. Asimismo, podemos llegar a la misma evaluación si reparamos en los parámetros cinéticos frente a los sustratos fluorogénicos. Esta tendencia, una K_m normal y una baja k_{cat} , se hizo especialmente patente en el caso del trisacárido 4MU- β -(GlcNAc)₃ con respecto a las otras dos endoquitinasas (AChi24 y BChi33) (Tabla 16). En este sentido, puesto que los datos que disponemos sobre la secuencia aminoacídica y la estructura de BChi14 son limitados, no podemos especificar en estos momentos cuales son los posibles factores diferenciales que expliquen esta menor velocidad de reacción. No obstante, a pesar de estas disimilitudes, es conveniente enfatizar que tanto el valor de la k_{cat} como el de la eficiencia catalítica de la isoenzima BChi14 frente a la hidrólisis de 4MU- β -(GlcNAc)₃ continuaron siendo considerablemente superiores que los encontrados en otras endoquitinasas de plantas (Hollis *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2003).

Los parámetros cinéticos de las 1,3- β -glucanasas de otras plantas y frutos frente a laminarina nos permiten establecer como éstas se disponen en dos grupos bien diferenciados en función de su velocidad de reacción. Por un lado, nos encontramos con enzimas con altos valores de la k_{cat} en especies como cebada o arroz (Hrmova *et al.*, 1993; Akiyama *et al.*, 1997; Dicko *et al.*, 2001). Por el otro, nos encontramos con 1,3- β -glucanasas con velocidades de hidrólisis entre 10 y 50 veces inferiores (Churngchow *et al.*, 1995; McCollum *et al.*, 1999; Subroto *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2008). Si analizamos los valores de la isoenzima AGlu19, podemos constatar como el bajo valor de su k_{cat} la encuadra en este último grupo, al igual que las procedentes de otros frutos como uva o naranja (Tabla 18). Aunque la afinidad que muestra por el sustrato es una de las más altas descritas hasta la fecha, la eficiencia catalítica resultante fue similar (Romero *et al.*, 2008) o sensiblemente inferior (Hrmova *et al.*, 1993; Akiyama *et al.*, 1997; Dicko *et al.*, 2001) a la de otros ejemplos de la bibliografía. No obstante, como indica Hrmova *et al.* (1993), resulta conveniente recordar que los valores de los parámetros k_{cat} o K_m de las hidrolasas frente a polisacáridos deben tratarse como resultados aproximados o utilizarse de un modo relativo. Las razones estriban en las interferencias causadas por la heterogeneidad en el tamaño de los sustratos de estas enzimas, los bajos valores de difusión en un medio acuoso de muchos polisacáridos o la propiedad de algunos productos de la hidrólisis de actuar como sustratos adicionales.

A pesar de tener una significativa eficiencia catalítica frente a CM-Chitin-RBV o a quitoooligosacáridos, la isoenzima BChi14 no mostró ningún efecto inhibitorio sobre el

crecimiento de las hifas de *B. cinerea* cuando fue aplicada individualmente (Fig. 77). Por tanto, y de acuerdo a los resultados y a las conclusiones llegadas para la isoenzima BChi33, el hecho de que una enzima tenga una determinada actividad degradativa *in vitro* frente a quitina o quitooligosacáridos no refleja con precisión su funcionalidad metabólica *in vivo* frente a la quitina del fitopatógeno. No obstante, en este trabajo también hemos demostrado que la mezcla 1:1 entre BChi14 y un extracto enriquecido en isoenzimas 1,3- β -glucanasa básicas de chirimoya implica una débil, pero significativa, actividad antifúngica frente a *B. cinerea* (Tabla 26). Este hallazgo no resulta sorprendente si tenemos en cuenta el modo de acción complementario de ambas enzimas hidrolíticas, el cual se ha hecho patente en la caracterización del efecto sinérgico en la isoenzima BChi33 o en otros sistemas *in vitro* e *in vivo* (Mauch *et al.*, 1988b, Sela-Buurlage *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1994; Jongedijk *et al.*, 1995; Joosten *et al.*, 1995; Kim y Hwang, 1997; Anand *et al.*, 2003b; Anand *et al.*, 2004).

A pesar de la abundante presencia de β -1,3-glucanos en la pared celular del hongo *B. cinerea* (Backhouse y Willetts, 1983), no resultó sorprendente la nula actividad antifúngica *in vitro* de la isoenzima AGlu19 (Fig. 77). En este sentido, aunque tanto las quitinasas como las 1,3- β -endoglucanasas de plantas se consideran proteínas antifúngicas (Stintzi *et al.*, 1993), existen múltiples ejemplos en la bibliografía que reflejan la ausencia de esta capacidad, siendo esto especialmente patente cuando actúan individualmente. Así, varios estudios establecen que, salvo excepciones puntuales (Ji y Kuć, 1996; Tonón *et al.*, 2002; Moustafa *et al.*, 2007), únicamente las 1,3- β -glucanasas básicas de clase I son efectivas en la lisis de las hifas del hongo y en la inhibición de su crecimiento (Sela-Buurlage *et al.*, 1993; Joosten *et al.*, 1995; Lawrence *et al.*, 1996; Anfoka y Buchenauer, 1997; Kim *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2009). Por otro lado, y al igual que BChi14, la actividad hidrolítica de la isoenzima AGlu19 frente a un sustrato artificial (laminarina) no predice *per se* su actividad antifúngica *in vitro*. Por tanto, la clasificación de una enzima basándonos únicamente en su habilidad a la hora de hidrolizar un determinado sustrato se trata de una útil simplificación y sólo implica un mero criterio formal. En suma, si integramos todas las discrepancias y contradicciones observadas acerca de este asunto en esta memoria, llegamos a la conclusión de que es absolutamente crítico establecer una distinción clara entre la actividad hidrolítica *in vitro* y la actividad antifúngica *in vitro* de quitinasas y 1,3- β -glucanasas.

La inducción coordinada de la isoenzimas AGlu19 y AChi24 en chirimoyas tratadas tras 9 días a 6 °C nos llevó a cuestionarnos si ambas presentaban un efecto sinérgico antifúngico como el detectado para otras combinaciones entre isoenzimas básicas. En este sentido, el ensayo *in vitro* de esta mezcla reveló un fuerte incremento de la actividad antifúngica, obteniendo unos valores de la inhibición del crecimiento del micelio de *B. cinerea* entre 2 y 3 veces superiores a los obtenidos por AChi24 en solitario (Tabla 26). Por tanto, estos resultados indicaron que ambas enzimas hidrolíticas actuaban de un modo simultáneo sobre el extremo apical de las hifas, tal y como ha sido observado para otras 1,3- β -glucanasas ácidas (Sela-Buurlage *et al.*, 1993, Ji y Kuć, 1996). Asimismo, este efecto sinérgico es consistente con el hecho de que las paredes celulares de los hongos se encuentren reforzadas por el entrecruzamiento entre diferentes polímeros, siendo necesaria en muchas ocasiones la acción simultánea de dos hidrolasas diferentes en la degradación

eficiente de las fibras mixtas de quitina-glucano (Theis y Stahl, 2004). Por otro lado, la combinación entre la isoenzima AGlu19 y un extracto enriquecido en las isoenzimas constitutivas AChi70, AChi40 y AChi27 (AChiC) no tuvo efecto alguno sobre el crecimiento de las hifas de *B. cinerea*. Teniendo en cuenta el potencial antifúngico de la isoenzima AGlu19 al ser combinado con AChi24 y que los dos componentes de la mezcla son incapaces por solitario de inhibir el crecimiento del micelio, existen dos posibles razones que expliquen este fenómeno. Por un lado, es posible que se requieran mayores cantidades activas de AGlu19 y AChiC para obtener una actividad antifúngica *in vitro* detectable. Por el otro, puede que sea necesaria la presencia de al menos una isoenzima ácida capaz de inhibir el crecimiento de las hifas del hongo por solitario para desarrollar este efecto sinérgico. En este sentido, la elevada actividad antifúngica *in vitro* de la mezcla entre la isoenzima AChi24 y un extracto enriquecido en las isoenzimas constitutivas AGluC (AGlu75 y AGlu36) parecen apoyar esta última hipótesis.

Es un hecho que la caracterización de la ultraestructura mediante LT-SEM, junto con los resultados obtenidos en trabajos previos (Merodio *et al.*, 1998; Muñoz *et al.*, 1999; Maldonado *et al.*, 2002b), reveló una menor extensión de los síntomas del daño por frío en el mesocarpo de las chirimoyas tratadas (Fig. 11). Si a esta situación sumamos al conocido efecto fungicida de los tratamientos con altas concentraciones de CO₂ (Kader, 1986; Barkai-Golán, 1990; Ahmadi *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 2006; Schotsmans *et al.*, 2006; Singh y Pal, 2008), podemos anticipar que la susceptibilidad al ataque por fitopatógenos en chirimoyas tratadas debería ser incluso menor que la baja prevalencia descrita en los frutos no tratados y conservados a bajas temperaturas (Reginato y Lizana, 1980; Marín, 1997; Cotroneo y Besoain, 1998; Pardo, 2001; Pentzke, 2006). Por tanto, aunque tanto BChi14 como AGlu19 se caracterizaron por una actividad antifúngica *in vitro* al ser combinados con otras isoenzimas que se acumulaban simultáneamente en el fruto, las evidencias experimentales de este trabajo no parecen apuntar a que la función principal de estas dos enzimas en el metabolismo de la chirimoya se ubiquen en una capacidad defensiva frente a un ataque concreto por fitopatógenos.

Aunque no se encuentra completamente elucidado el papel exacto de las quitinasas y 1,3- β -glucanasas en el metabolismo de las plantas durante su exposición al frío, en los últimos años se han obtenidos importantes evidencias sobre un cierto papel crioprotector *in vitro* de proteínas y membranas. Así, se ha observado una importante actividad anticongelante (Yeh *et al.*, 2000; Yaish *et al.*, 2006) o actividad crioprotectora *in vitro* (Hincha *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 2008; Fernandez-Caballero *et al.*, 2009; Kikuchi *et al.*, 2009) en diferentes quitinasas y 1,3- β -glucanasas. En este sentido, las curvas de dosis-respuesta de las isoenzimas BChi14 y AGlu19 mostraron que ambas isoenzimas poseían una importante función crioprotectora sobre la desnaturalización de LDH durante su congelación. Incluso la adición de concentraciones tan bajas como 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ tuvieron un efecto significativo sobre la viabilidad de LDH (Fig. 82). Además, tal y como ha sido descrito para varias dehidrinas crioprotectoras, la utilización de la isoenzima BChi14 implicó actividades catalíticas de LDH superiores al 100 %, demostrando un efecto estabilizador neto sobre la estructura oligomérica de esta enzima (Lin y Thomashow, 1992; Wisniewski *et al.*, 1999; Bravo *et al.*, 2003). Por otro lado, estos resultados contrastaron con la baja actividad

crioprotectora *in vitro* de BSA en el rango de concentraciones utilizado para BChi14 y AGlu19. Concretamente estas enzimas fueron más efectivas que esta albúmina, mostrando valores entre 9 y 13 veces en escala másica y casi 3 veces en escala molar (Tabla 27). Este factor es de especial relevancia, ya que el BSA se ha considerado tradicionalmente una proteína crioprotectora gracias a su capacidad de concentración en la interfase hielo-agua, previniendo la desnaturalización y la agregación (Tamiya *et al.*, 1985; Nema y Avis, 1993). Por otro lado, la gran variabilidad observada en la bibliografía del valor del potencial crioprotector del BSA, nos llevo a calcular una relación entre la PD₅₀ de este patrón y la PD₅₀ obtenida para otras proteínas de plantas. Esta normalización de los resultados constató que las isoenzima BChi14 y AGlu19 eran las proteínas PR con mayor actividad crioprotectora *in vitro* frente a LDH descritas hasta la fecha, superando con creces el valor descrito para una PR-5 apoplástica (Dave y Mitra, 1998) o una quitinasa de clase I (Fernandez-Caballero *et al.*, 2009). Asimismo, estas isoenzimas de chirimoya mostraron una efectividad superior o del orden a la observada en algunas dehidrinas acumuladas durante la aclimatación al frío de diferentes plantas (Wisniewski *et al.*, 1999; Hara *et al.*, 2001; Momma *et al.*, 2003).

Por otro lado, también analizamos termodinámicamente si BChi14 y AGlu19 mostraban características que las definiesen como AFP, cuantificando su posible THA en disoluciones acuosas concentradas de ambas isoenzimas. Así, en sus respectivos termogramas, la ausencia absoluta de cualquier tipo de retraso en el pico de recristalización del agua denotó que BChi14 y AGlu19 carecían de la habilidad para unirse a los núcleos de hielo e inhibir su crecimiento (Fig. 85). A pesar de la funcionalidad crioprotectora de BChi14 y AGlu19, en esta tesis se ha demostrado también que el resto de isoenzimas purificadas (AChi24, AChi26, AChi48 y BChi33) no presentaron ni valores significativos de actividad crioprotectora *in vitro* (Fig. 81) ni una clara actividad anticongelante (Fig. 84-86). En este sentido, estos resultados confirmarían los argumentos expuestos por otros autores (Hon *et al.*, 1995; Hinch *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 2008), los cuales sugieren que las propiedades crioprotectoras adicionales no son unas características definitorias de las proteínas PR inducidas bajo un estrés por frío. Como ha apuntado Yeh *et al.* (2000), es posible que ligeras diferencias en la composición de aminoácidos de estas proteínas PR modifiquen sus propiedades y les permitan adquirir funciones adicionales a las de defensa frente al estrés por frío. En este sentido, tanto BChi14 como AGlu19 son unos interesantes ejemplos de quitinasas y 1,3-β-glucanasas que han adquirido una nueva función no hidrolítica. Asimismo, todas estas evidencias experimentales contribuyen a un mejor entendimiento de por qué son sintetizadas en plantas tantas clases diferentes de proteínas PR.

Como puede advertirse en la Figura 82, la actividad crioprotectora *in vitro* de AGlu19 y BChi14 fue entre 2 y 3 ordenes de magnitud superior que la observada para otro soluto compatible como es la sacarosa. Este resultado fue coincidente con el descrito por Hare *et al.* (2001) al comparar el potencial de una dehidrina crioprotectora de mandarina con otros compuestos similares. Por tanto, la inducción de BChi14 y AGlu19 podría constituir una herramienta *in vivo* mucho más eficiente que la acumulación de osmoprotectores para la protección de membranas (Hare *et al.*, 2001; Rorat, 2006; Kikuchi *et al.*, 2009) o importantes

enzimas criolábiles como catalasa, piruvato quinasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa o ATPasa (Shikama y Yamazaki, 1961; Long, 1983; Privalov, 1990; Krall y Edwards, 1993). En última instancia, esto implicaría que las células del mesocarpo de chirimoyas tratadas con CO₂ reducirían los desequilibrios metabólicos asociados a la conservación a bajas temperaturas, minimizando o retrasando el desarrollo de algunos de los síntomas del daño por frío. Por tanto, por sus propiedades crioprotectoras, tanto BChi14 como AGlu19 estarían implicadas en la respuesta de adaptación a las bajas temperaturas asociada con el mecanismo de defensa activado por altas concentraciones de CO₂. En este sentido, en otra memoria de investigación se ha descrito como la aplicación de un pretratamiento con altas concentraciones de CO₂ en chirimoyas ‘Fino de Jete’ conservadas a 4 °C implica la inducción de HSPs de baja masa molecular con actividad protectora frente a diversos estreses de origen abiótico (Sevillano, 2007). Por otro lado, recientemente se ha observado la existencia de un efecto sinérgico en la actividad chaperona de una proteína crioprotectora de tomate al ser combinada con glicina betaína (Honrad y Bar-Zvi, 2008). En este sentido, existen varios estudios que han establecido el papel de este mismo compuesto en la inducción de genes sensibles al frío (Allard *et al.*, 1998) o proteínas PR (Xing y Rajashekar, 1997; Burketová *et al.*, 2003). Aunque hay que realizar futuros experimentos en este aspecto, la coincidencia entre el máximo de acumulación de glicina betaína y la inducción de las isoenzimas BChi14 y AGlu19 hace plausible la existencia hipotética de algún tipo de interacción entre ambos elementos. Por tanto, todos estos resultados indican que el incremento de la tolerancia a las bajas temperaturas en chirimoyas se trata de un proceso muy complejo y que implica muchos cambios bioquímicos y fisiológicos, tal y como ha sido descrito en otras plantas y frutos (Sevillano *et al.*, 2009).

A pesar de que en los últimos años son numerosos los trabajos que han evaluado la protección al daño por frío por la aplicación de diferentes tratamientos post-recolección en base al concepto de estrés cruzado, podemos concluir que la interacción específica entre dos factores de estrés abiótico dispares sobre un fruto sensible al frío como la chirimoya refleja uno de los aspectos más atractivos e intrigantes estudiados a lo largo de esta memoria de investigación: la inducción de una quitinasa y una 1,3- β -glucanasa con importantes actividades crioprotectoras *in vitro* tras un prolongado tiempo de conservación a bajas temperaturas asociado a un corto pretratamiento gaseoso con altas concentraciones de CO₂. Asimismo, esta respuesta parece estar implicada en un aparentemente complejo mecanismo bioquímico y fisiológico conducente a la adquisición de una mayor tolerancia a las bajas temperaturas. En consecuencia, es absolutamente necesario profundizar tanto en la identificación de nuevos componentes asociados a este aumento de tolerancia como a la posible acción recíproca entre sus mecanismos crioprotectores.

Por último, resaltar las posibles aplicaciones biotecnológicas e industriales de las isoenzimas BChi14 (solicitud de patente P200801914, 2008) y AGlu19 (solicitud de patente P200801931, 2008) de acuerdo a su potente actividad crioprotectora a bajas concentraciones, su origen natural, su no toxicidad y el bajo coste de obtención. Al igual que se ha descrito con proteínas de trigo relacionadas con la tolerancia a la congelación (Grondin *et al.*, 2009), estas enzimas presentan un prometedor potencial de aplicación en la industria médica y farmacéutica

para la crioconservación de proteínas, células, tejidos u órganos en sustitución de crioprotectores tradicionales como el DMSO. Además, la significativa actividad hidrolítica de estas enzimas a 5 °C implica una posible utilización en aquellos procesos industriales de biocatálisis que requieran bajas temperaturas. Asimismo, una vez clonados los genes que codifican BChi14 y AGlu19, podría estudiarse el papel de estas proteínas en el incremento de la tolerancia a las bajas temperaturas de diversos cultivos de elevado interés económico.

CONCLUSIONES

- 1- Se ha definido el patrón de expresión y actividad hidrolítica de quitinasas y 1,3- β -glucanasas ácidas y básicas en chirimoya y su regulación por el proceso de maduración, las bajas temperaturas de conservación y altas concentraciones de CO₂.
- 2- Durante la maduración sólo las quitinasas inducidas transitoriamente están relacionadas con una respuesta activa de defensa antifúngica., actuando en dos fases: la primera asociada a la inducción de una isoenzima ácida de 26 kDa en fruto maduro y una segunda a la isoenzima básica de 33 kDa en fruto pre-senescente.
- 3- Las bajas temperaturas de conservación retrasan el patrón de inducción y actividad antifúngica específicos de maduración, e inducen dos nuevas quitinasas ácidas: la isoenzima AChi24, que junto a la inducción de AChi26 forma parte de la fase inicial del establecimiento del daño por frío, y la isoenzima AChi48, expresada en la interfase de reversibilidad del mismo.
- 4- El pretratamiento con altos niveles de CO₂ adelanta la expresión de la isoenzima AChi48, y ejerce un efecto residual dual: por un lado retrasa la expresión coordinada de las isoenzimas AChi24 y AChi26, y, por el otro, activa la inducción de las isoenzimas BChi14 y AGlu19 relacionadas con el desarrollo de actividad crioprotectora en estos frutos.
- 5- La endoquitinasa AChi24 y la 1,4- β -(N)-acetilhexosaminidasa AChi26 son estables en un amplio rango de pH y temperatura, presentan una elevada eficiencia catalítica y un mecanismo de hidrólisis complementario. El elevado efecto sinérgico en la actividad hidrolítica y antifúngica de estas enzimas les permite desarrollar un eficaz sistema de pre-defensa de protección del fruto frente a potenciales patógenos.
- 6- La quitobiosidasa antifúngica AChi48 está regulada por una cooperatividad cinética positiva. Sus inusuales características catalíticas a bajas temperaturas, su inestabilidad térmica y el valor de sus parámetros termodinámicos la definen como la primera quitinasa adaptada al frío procedente de plantas.-
- 7- La endoquitinasa BChi33 muestra una elevada eficiencia catalítica, una cooperatividad cinética positiva y una significativa actividad antifúngica, que se ve potenciada sinérgicamente con 1,3- β -glucanasas básicas. Estas propiedades junto con su inducción en tejidos dañados estructuralmente identifican a BChi33 como un marcador de la pérdida de integridad celular, proporcionando al fruto de un mecanismo de defensa activo frente a potenciales patógenos.
- 8- Las isoenzimas BChi14 y AGlu19 inducidas por el pretratamiento con altas concentraciones de CO₂ muestran una significativa actividad hidrolítica a bajas temperaturas, clasificando a AGlu19 como una enzima adaptada al frío por su

comportamiento termodinámico. Ambas proteínas presentan una potente actividad crioprotectora que las define como endohidrolasas bifuncionales, estando asociadas al mantenimiento de la estructura celular y formando parte, junto a la glicina betaína, del mecanismo de tolerancia a las bajas temperaturas activado por CO₂.

- 9- Las especiales características bioquímicas, cinéticas y funcionales de estas enzimas purificadas de chirimoya y su regulación diferencial por señales endógenas, ambientales y de estrés cruzado son un excelente modelo para el estudio de su implicación fisiológica dentro de las estrategias ligadas a la adquisición de nuevas funciones en isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D.J. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150: 2029-2035.
- Agrawal, G.K., Rakwal, R. 2006. Rice proteomics: A cornerstone for cereal food crop proteomes. *Mass Spectrometry Review* 25: 1-53.
- Ahmadi, H., Biasi, W.V., Mitcham, E.J. 1999. Control of brown rot decay of nectarines with 15% carbon dioxide atmospheres. *Journal of American Society of Horticultural Science* 124: 708-712.
- Ainslie, G.R., Shill, J.P., Neet, K.E. 1972. Transients and Cooperativity: A slow transition model for relating transients and cooperative kinetics of enzymes. *The Journal of Biological Chemistry* 247: 7088-7096.
- Akimoto-Tomiyama, C., Sakata, K., Yazaki, J., Nakamura, K., Fujii, F., Shimbo, K., Yamamoto, K., Sasaki, T., Kishimoto, N., Kikuchi, S., Shibuya, N., Minami, E. 2003. Rice gene expression in response to N-acetylchitoooligosaccharide elicitor: comprehensive analysis by DNA microarray with randomly selected ESTs. *Plant Molecular Biology* 52: 537-551.
- Akiyama, T., Shibuya, N., Hrmova, M., Fincher, G.B. 1997. Purification and characterization of a (1→3)-beta-D-glucan endohydrolase from rice (*Oryza sativa*) bran, *Carbohydrate Research* 297: 365-374.
- Aktar Hossain, M., Noh, H.N., Kim, K.I., Koh, E.J., Wi, S.G., Bae, H.J., Lee, H., Hong, S.W. 2010. Mutation of the chitinase-like protein-encoding AtCTL2 gene enhances lignin accumulation in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Plant Physiology* 167: 650-658.
- Albersheim, P., Jones, T.M., English, P.D. 1969. Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes. *Annual Review of Phytopathology* 7: 171-194.
- Alexander, D., Goodman, R.M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl Goy, P., Luntz, T., Ward, E., Ryals, J.A. 1993. Increased tolerance to two *Oomycete* pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis related protein 1a. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 7327-7331.
- Ali, Z.M., Chin, L.H., Lazan, H. 2004. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. *Plant Science* 167: 317-327.
- Alique, R., Oliveira, G.S. 1994. Changes in sugars and organic acids in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) fruit under controlled atmosphere storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 799-803.
- Alique, R., Zamorano, J.P. 2000. Influence of harvest date within the season and cold storage on cherimoya fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 4209-4216.
- Alique, R., Zamorano, J.P., Calvo, M.L., Merodio, C., De la Plaza, J.L. 1994. Tolerance of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) to cold storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119: 524-528.
- Alique, R.. 1995. Residual effects of short-treatment with high CO₂ on the ripening of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) fruit. *Journal of Horticultural Science* 70: 609-615.
- Allard, F., Houde, M., Kröl, M., Ivanov, A., Huner, N.P.A., Sarhan, F. 1998. Betaine Improves Freezing Tolerance in Wheat. *Plant Cell Physiology* 39: 1194-1202.
- Allona I., Collada, C., Casado, R., Paz-Ares, J., Aragoncillo, C. 1996. Bacterial expression of an active class Ib chitinase from *Castanea sativa* cotyledons. *Plant Molecular Biology* 32: 1171-1176.
- Aloise, P.A., Lumme, M., Haynes, C.A. 1996. N-Acetyl-D-glucosamine production from chitin-waste using chitinases from *Serratia marcescens*. En: *Chitin enzymology*, Muzzarelli, R.A.A. (eds.), vol 2, Atec edizioni, Italy. pp: 581-594.
- Aloni R., Peterson, C.A. 1997. Auxin promotes dormancy callose removal from the phloem of *Magnolia kobus* and callose accumulation and earlywood vessel differentiation in *Quercus robur*. *Journal of Plant Research* 110: 37-44.
- Alonso, J.M., Garcia-Martinez, J.L., Chamarro, J. 1992. Two dimensional gel electrophoresis patterns of total, *in vivo* labelled and *in vitro* translated polypeptides from orange flavedo during maturation and following ethylene treatment. *Plant Physiology* 85: 147-156.
- Altenbach, D., Robatzek, S. 2007. Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1031-1039.

- Anand, A., Lei, Z., Sumner, L.W., Mysore, K.S., Arakane, Y., Bockus, W.W., Muthukrishnan, S. 2004. Apoplastic extracts from a transgenic wheat line exhibiting lesion-mimic phenotype have multiple pathogenesis-related proteins that are antifungal. *Molecular Plant Microbe-Interactions* 17: 1306-1317.
- Anand, A., Zhou, T., Trick, H.N., Gill, B.S., Muthukrishnan, S. 2003. Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. *Journal of Experimental Botany* 54: 1001-1111.
- Ancillo, G., Witte, B., Schmelzer, E., Kombrink, E. 1999. A distinct member of the basic (class I) chitinase gene family in potato is specifically expressed in epidermal cells. *Plant Molecular Biology* 39: 1137-1151.
- Andersen, M.D., Jensen, A., Robertus, J.D., Leah, R., Skriver, K. 1997. Heterologous expression and characterization of wild-type and mutant forms of a 26 kDa endochitinase from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Biochemical Journal* 322: 815-822.
- Andersen, O.A., Dixon, M.J., Eggleston I.M., van Aalten, D.M. 2005. Natural product family 18 chitinase inhibitors. *Natural Product Reports* 22: 563-579.
- Anderson, J.P., Badruzsaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehler, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R., Kazan, K. 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16: 3460-3479.
- Anderson, M.D., Prasad, T.K., Martin, B.A., Stewart, C.R., 1994. Differential gene expression in chilling-acclimated maize seedlings and evidence for the involvement of abscisic acid in chilling tolerance. *Plant Physiology* 105, 331-339.
- Andres, J., Rebollar, A. 1996. *El cultivo de la chirimoya (A. cherimola Mill.) en el Estado de Michoacán*, Universidad Autónoma de Chapingo, pp.61.
- Anfoka, G., Buchenauer, H. 1997. Systemic acquired resistance in tomato against *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with tobacco necrosis virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50: 85-101.
- Angelini, R., Tisi, A., Rea, G., Chen, M.M., Botta, M., Federico, R., Cona, A. 2008. Involvement of polyamine oxidase in wound healing. *Plant Physiology* 146:162-177.
- Anguelova, M.V., Westhuizen, V.D., Pretorius, Z.A. 2001. β -1,3-glucanase and chitinase activities and the resistance response of wheat to leaf rust. *Journal of Phytopathology* 149: 381-384.
- Ano, A., Takayanagi, T., Uchibori, T., Okuda, T., Yokotsuka, K. 2003. Characterization of a class III chitinase from *Vitis vinifera* cv. Koshu. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95: 645-647.
- Antikainen, M., Griffith, M. 1997. Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals. *Physiologia Plantarum* 99: 423-432.
- Antinow, J.F., Ritter, C.E., Pierpoint, W.S., Van Loon, L.C. 1980. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *Journal of General Virology* 47: 79-87.
- Aparicio-Saguilán, A., Méndez-Montecalvo, G., Solorza-Feria, J., Bello-Pérez, L. 2006. Thermal and viscoelastic properties of starch gels from maize varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 1078-1086.
- Arakane, Y., Zhu, Q., Matsumiya, M., Muthukrishnan, S., Kramer, K.J. 2003. Properties of catalytic, linker and chitin-binding domains of insect chitinase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33: 631-648.
- Araki, T., Torikata, T. 1995. Structural classification of plant chitinases: two subclasses in class I and class II chitinases. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 59: 336-338.
- Arie, M., Hikichi, K., Takahashi, K., Esaka, M. 2000. Characterisation of basic chitinase which is secreted by cultured pumpkin cells. *Physiologia Plantarum* 110: 232-239.
- Arlorio, M., Ludwig, A., Boller, T., Bonfante, P. 1992. Inhibition of fungal growth by plant chitinases and β -1,3-glucanases. A morphological study. *Protoplasma* 171: 34-43.
- Armero, J., Tena, M. 2001. Possible role of plasma membrane H⁺-ATPase in the elicitation of phytoalexin and related isoflavone root secretion in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings. *Plant Science* 161: 791-798.
- Arrhenius, S. 1889. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 4: 226-248.

- Artés, F., Escriche, A.J. 1994. Intermittent warming reduces chilling injury and decay of tomato fruit. *Journal of Food Science* 59: 1053-1056.
- Artés, F., García, F., Marquina, J., Cano, A., Fernández-Trujillo, J.P. 1998. Physiological responses of tomato fruit to cyclic intermittent temperature regimes. *Postharvest Biology and Technology* 14: 283-296.
- Artés-Hernández F., Aguayo E., Artés F. 2004. Alternative atmosphere treatments for keeping quality of 'Autumn seedless' table grapes during long cold storage. *Postharvest Biology and Technology* 31: 59-67.
- Artus, N.N., Uemura, M., Steponkus, P.L., Gilmour, S.J., Lin, C., Thomashow, M.F. 1996. Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13404-13409.
- Ary, M.B., Richardson, M., Shewry, P.R. 1989. Purification and characterization of an insect α -amylase inhibitor/endochitinase from seeds of Job's tears (*Coix lachrymal-jobi*). *Biochimica et Biophysica Acta* 93: 260-266.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., Sheen, J. 2002. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415: 977-983.
- Assis, J.S., Maldonado, R., Muñoz, T., Escribano, M.I., Merodio, C. 2001. Effect of high carbon dioxide concentration on PAL activity and phenolic contents in ripening cherimoya fruit. *Postharvest Biology and Technology* 23: 33-39.
- Atici, O., Nalbantoglu, B. 2003. Antifreeze proteins in higher plants. *Phytochemistry* 64: 1187-96.
- Atkins, G.L., Nimmo, I.A. 1975. A comparison of seven methods for fitting the Michaelis-Menten equation. *Biochemical Journal*. 149, 775-777.
- Avice J.C., Dily F.L., Goulas E., Noquet C., Meuriot F., Volenec J.J., Cunningham S.M., Sors T.G., Dhont C., Castonguay Y., Nadeau P., Bélanger G., Chalifour F.P., Ourry, A. 2003. Vegetative storage proteins in overwintering storage organs of forage legumes: roles and regulation. *Canadian Journal of Botany* 81: 1198-1212.
- Avice, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*, Harvard University Press, Cambridge. pp. 447.
- Avice, J.C. 2004. *Molecular markers, natural history and evolution*, 2nd edn, Sinauer Associates, Sunderland. pp. 541.
- Awade, A., de Tapia, M., Burkard, B. 1989. Biological function of bean pathogenesis-related (PR 3 and PR 4) proteins. *Plant Science* 63: 121-130.
- Backhouse, D., Willetts, H.J. 1984. A histochemical study of sclerotia of *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*. *Canadian Journal of Microbiology* 30: 171-178.
- Bade, M.L., Stinson, A. 1979. Molting fluid chitinase: a homotropic allosteric chitinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 87: 349-353.
- Badur, R., Herbers, K., Monke, G., Ludwig, F., Sonnewald, U. 1994. Induction of pathogenesis-related proteins in sugar accumulating tobacco leaves. *Photosynthetica* 30: 575-582.
- Baek, J.H., Han, B.K., Jo, D.H. 2001. Distribution of chitinases in rice (*Oryza sativa* L.) seed and characterization of a hull-specific chitinase. 2001. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 34: 310-315.
- Baginsky S, Grossmann J, Gruissem W. 2007. Proteome analysis of chloroplast mRNA processing and degradation. *Journal of Proteome Research* 6: 809-820.
- Ballester, A.R., Izquierdo, A., Lafuente, M.T., González-Candelas, L. 2010. Biochemical and molecular characterization of induced resistance against *Penicillium digitatum* in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 56: 31-38.
- Barber, M.S., Ride, J.P. 1989. Purification and properties of a wheat leaf N-acetyl- β -D-hexosaminidase. *Plant Science* 60: 163-172.
- Barkai-Golán, R. 1990 Postharvest disease suppression by atmospheric modifications. En: *Food preservation by modified atmospheres*, Calderon, M., Barkai-Golán, R. (eds.) CRC press, Florida. pp: 237-265.
- Barre, A., Culerrier, R., Granier, C., Selman, L., Peumans, W.J., Van Damme, E.J., Bienvenu, F., Bienvenu, J., Rougé, P. 2009. Mapping of IgE-binding epitopes on the major latex allergen Hev b 2 and the cross-reacting 1,3 beta-glucanase fruit allergens as a molecular basis for the latex-fruit syndrome. *Molecular Immunology* 46: 1595-1604.

- Beaudry, R.M. 1999. Effect of O₂ and CO₂ partial pressure on selected phenomena affecting fruit and vegetable quality. *Postharvest Biology and Technology* 15: 293-303.
- Beck, W.S. 1967. Regulation of cobamide-dependent ribonucleotide reductase by allosteric effectors and divalent cations. *The Journal of Biological Chemistry* 242: 3148-3158.
- Beerhues, L., Kombrink, E. 1994. Primary structure and expression of mRNAs encoding basic chitinase and 1,3- β -glucanase in potato. *Plant Molecular Biology* 24:353-367.
- Beffa, R.S., Neuhaus, J.M., Meins, F.J. 1993. Physiological compensation in antisense transformants: Specific induction of an ersatz glucan endo-1,3- β -glucosidase in plants infected with necrotizing viruses. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 8792-8796.
- Békésiová, B., Hraška, S., Libantová, J., Moravčíková, J., Matušiková, I. 2008. Heavy-metal stress induced accumulation of chitinase isoforms in plants. *Molecular Biology Reports* 35: 579–588.
- Ben-Amor, M., Flores, B., Latché, A., Bouzayen, M., Pech, J.C., Romojaro, F. 1999. Inhibition of ethylene biosynthesis by antisense ACC oxidase RNA prevents chilling injury in Charentais cantaloupe melons. *Plant, Cell and Environment* 22: 1579-1586.
- Benhamou, N., Asselin, A. 1989. Attempted localization of a substrate for chitinases in plant cells reveals abundant N-acetyl-D-glucosamine residues in secondary walls. *Biology of the Cell* 67: 341–350.
- Bentahir, M., Feller, G., Aittaleb, M., Lamotte-Brasseur, J., Himri, T., Chessa, J.P., Gerday, C. 2000. Structural, kinetic, and calorimetric characterization of the cold-active phosphoglycerate kinase from the antarctic *Pseudomonas* sp. TACII18. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 11147–11153.
- Berglund, L., Brunstedt, J., Nielsen, K.K., Chen, Z.C., Mikkelsen, J.D., Marcker, K.A. 1995. A proline-rich chitinase from *Beta vulgaris*. *Plant Molecular Biology* 27: 211-216.
- Berman, W.P., Lasky, L.A. 1985. Engineering glycoproteins for use as pharmaceuticals. *Trends in Biotechnology* 3: 51-53.
- Bertolini, P., Lanza, G., Tonini, G. 1991. Effect of pre-storage carbon dioxide treatments and storage temperatures on membranosis of 'Femminello comune' lemons. *Scientia Horticulturae* 46: 89-95.
- Bishop, J.G., Dean, A.M., Mitchell-Olds, T. 2000. Rapid evolution in plant chitinases: molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 5322-5327.
- Bittel, P., Robatzek, S. 2007. Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 335-341.
- Blanke, M.M., Notton, B.A. 1991. Kinetics and physiological significance of photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase in avocado fruit. *Journal of Plant Physiology* 137: 553–558.
- Bogdanović, J., Mojović, M., Milosavić, N., Mitrović, A., Vucinić, Z., Spasojević, I. 2008. Role of fructose in the adaptation of plants to cold induced oxidative stress. *The European Biophysical Journal* 37: 1241–1246.
- Bokma, E., Spiering, M., Chow, K.S., Mulder-Patty, P.M.F., Subroto, T., Beintema, J.J. 2001. Determination of cDNA and genomic DNA sequences of hevamine, a chitinase from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 367-376.
- Bolar, J.P., Norelli, J.L., Harman, G.E., Brown, S.K., Aldwinckle, H.S. 2001. Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Transgenic Research* 10: 533-543.
- Bolen, D.W., Baskakov, I.V. 2001. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *Journal of Molecular Biology* 310: 955-963.
- Boller, T., Gehri, A., Mauch, F., Vögeli, U. 1983. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* 157: 22-31.
- Boller, T., Gehri, A., Mauch, F., Vögeli, U. 1988. Chitinase from *Phaseolus vulgaris* leaves. *Methods of Enzymology* 161: 479-484.
- Bonomelli, A., Laurence Mercier, L., Franchel, J., Baillieul, F., Benizri, E., Mauro, M.C. 2004. Response of Grapevine Defenses to UV-C Exposure. *American Journal of Enology and Viticulture* 55: 51-59.

- Boot R.G., Blommaart, E.F.C., Swart, E., Ghauharali-van der Vlugt, K., Bijl, N., Moe, C., Place A., Aerts, J.M.F.G. 2001. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitobiosidase. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 6770-6778.
- Boot, R.G., Renkema, G.H., Strijland, A., van Zonneeld, A.J., Aerts, J.M. 1995. Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 26252-26256.
- Botha, A.M., Nagel, M.A.C., Van der Westhuizen, A.J., Botha F.C. 1998. Chitinase isoenzymes in near isogenic wheat lines challenged with Russian wheat aphid, exogenous ethylene, and mechanical wounding. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 39: 99-106.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J. 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* 140: 103-125.
- Boudart, G., Jamet, E., Rossignol, M., Lafitte, C., Borderies, G., Jauneau, A., Esquerré-Tugayé, M.T., Pont-Lezica, R. 2005. Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: Identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics* 5: 212-221.
- Bouquelet, S., Spik, G. 1978. Properties of four molecular forms of N-acetyl-beta-D-hexosaminidase isolated from germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *European Journal of Biochemistry*, 84: 551-559.
- Bourot, S., Sire, O., Trautwetter, A., Touze, T., Wu, L.F., Blanco, C., Bernard, T. 2000. Glycine betaine-assisted protein folding in a lysA mutant of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 1050-1056.
- Bowls, D. 1990. Defense-related proteins in higher plants. *Annual Review of Biochemistry* 59: 873-907.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bramalage, W.J., Meir, S. 1990. Chilling injury of crops of temperate origin. En: *Chilling injury of horticultural crops*, Wang, C.Y. (ed.). CRC Press, Boca Raton Florida. pp: 37-50.
- Brameld, K.A., Shrader, W.D., Imperiali, B., Goddard, W.A.III. 1998. Substrate assistance in the mechanism of family 18 chitinases: theoretical studies of potential intermediates and inhibitors. *Journal of Molecular Biology* 280: 913-923.
- Bravo, L.A., Gallardo, J., Navarrete, A., Olave, N., Martinez, J., Alberdi, M., Close, T.J., Corchera, L.J. 2003. Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley. *Physiologia Plantarum* 118: 262-269.
- Bravo, L.A., Zuñiga, G.E., Corcuera, L.J., Argandoña, V.H. 1997. Freezing tolerance of barley seedlings infested by aphids. *Journal of Plant Physiology* 150: 611-614.
- Brederode, F., Linthorst, H., Bol, J. 1991. Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. *Plant Molecular Biology* 17: 1117-1125.
- Broekaert, W.F., Van Parus, J., Allen, A.K., Peumans, W.J. 1988. Comparison of some molecular, enzymatic and antifungal properties of chitinases from thorn-apple, tobacco and wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 33: 319-331.
- Brogie, K.E., Biddle, P., Cressman, R., Brogie, R. 1989. Functional analysis of DNA sequences responsible for ethylene regulation of a bean chitinase gene in transgenic tobacco. *The Plant Cell* 1: 599-607.
- Brogie, K.E., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C.J., Brogie, R. 1991. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254: 1194-1197.
- Brogie, K.E., Gaynor, J.J., Brogie, R. 1986. Ethylene-regulated gene expression: molecular cloning of the genes encoding an endochitinase from *Phaseolus vulgaris*. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 6820-6824.
- Brogie, R., Brogie, K.E. 1994. Chitinase gene expression in transgenic plants: a molecular approach to understanding plant defence responses. En: *The Production and Uses of Genetically Transformed Plants*. Bevan, M.W., Harrison, B.D., Leaver, C.J. (eds), Chapman and Hall, London. pp: 77-82.
- Brown R.C., Lemmon B.E., Stone B.A., Olsen O.A. 1997. Cell wall (1 → 3) and (1 → 3, 1 → 4)-β-glucans during early grain development in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 202: 414-426.

- Bruggemann, S., Klaucke, S., Maaskantel, K. 1994. Long-term chilling of young plants under low light 5. Kinetic and molecular properties of two key enzymes of the Calvin cycle in *Lycopersicon esculentum* Mill and *L. peruvianum* Mill. *Planta*, 194: 160-168.
- Bruni, F., Leopold, A.C. 1992. Cytoplasmatic glass formation in maize embryos. *Seed Science Research* 2: 251-253.
- Brunner, F., Stintzi, A., Fritig, B., Legrand, M. 1998. Substrate specificities of tobacco chitinases. *The Plant Journal* 14: 225-234.
- Brurberg, M.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G. 1996. Comparative studies of chitinase A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology* 142: 1581-1589.
- Brzeski, M.M. 1987. Chitin and chitosan-putting waste to good use. *Infofish International* 5: 31-33.
- Bucciaglia, P.A., Smith, A.G. 1994. Cloning and characterization of Tag1, a tobaccoanther β -1,3-glucanase expressed during tetrad dissolution. *Plant Molecular Biology* 24: 903-914.
- Büchter, R., Strömberg, A., Schmelzer, E., Kombrink, E. 1997. Primary structure and expression of acidic (class II) chitinase in potato. *Plant Molecular Biology* 35: 749-761.
- Burketová, L., Feltlova, M., Sindelarova, M. 2003. Immunohistological analysis of chemically induced proteins in sugar beet. *Biologia Plantarum* 47: 243-251.
- Cabib, E. 1988. Endochitinase from wheat germ. *Methods of Enzymology* 161: 498-501.
- Cachinero, J.M., Cabello, F., Jorin, J., Tena, M. 1996. Induction of different chitinase and β -1,3-glucanase isoenzymes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings in response to infection by *Plasmopara halstedii*. *European Journal of Plant Pathology* 102: 401-405.
- Cai, Q., Moore, G.A., Guy, C. L. 1995. An unusual group 2 LEA gene family in citrus responsive to low temperature. *Plant Molecular Biology* 29: 11-23.
- Campos, P.S., Quartin, V., Ramalho, J.C., Nunes, M.A. 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of CoffeaSP plants. *Journal of Plant Physiology* 160: 283-292.
- Candan, A.P., Graell, J., Larrigaudière, C. 2008. Roles of climacteric ethylene in the development of chilling injury in plums. *Postharvest Biology and Technology* 47: 107-112.
- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research* 37: 233-238.
- Canterelli, C., Brenna, O., Giovanelli, G., Rossi, M. 1989. Beverage stabilization through enzymic of phenolics. *Food Biotechnology* 3: 203-213.
- Cao, S., Zheng, Y., Wang, K., Rui, H., Tang, S. 2009. Effect of 1-methylcyclopropene treatment on chilling injury, fatty acid and cell wall polysaccharide composition in loquat fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 8439-8443.
- Carpenter, J.F., Crowe, J.H. 1988. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology* 25: 244-255.
- Carrasco, P., Beltrán, J.P., Peretó, J.G., Granell, A. 1983. 1,3- β -Glucan hydrolase from citrus. *Phytochemistry*. 22: 2699-2701.
- Carratù, G., Colacino, C., Conti, S., Giannattasio, M. 1985. β -N-acetylglucosaminidase and β -galactosidase from aleurone layers of resting wheat grains. *Phytochemistry* 24: 1465-1469.
- Carsolio, C., Gutiérrez, A., Jimenez, B., Van Montagu, M., Herrera-Estrella, A. 1994. Characterization of *ech-42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 10903-10907.
- Castresana, C., de Carvalho, E., Godelieve, G., Habets, M., Inzé, D., Montagu, M.V. 1990. Tissue-specific and pathogen-induced regulation of a *Nicotiana plumbaginifolia* β (1,3)glucanase gene. *The Plant Cell* 2: 1131-1143.
- Chang, C. T., Hsueh, Y.L., Sung, H.Y. 1996. Purification and properties of chitinase from cabbage stems with roots. *Biochemistry and Molecular Biology International* 40: 417-425.
- Chang, C.T., Young, F.P., Chang, M.H., Sung, H.Y. 1998. Purification and properties of β -N-acetylhexosaminidase from cabbage. *Biochemistry and Molecular Biology International* 45: 371-380.

- Chaplin, G.R., Wills, R.B., Graham, D. 1983. Induction of chilling injury in stored avocados with exogenous ethylene. *HortScience* 18: 952–953.
- Chattopadhyay, M.K., Tiwari, B.S., Chattopadhyay, G., Bose, A., Sengupta, D.N., Ghosh, B. 2002. Protective role of exogenous polyamines on salinity-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* 116: 192–199.
- Chaves, I., Pinheiro, C., Paiva, J.A., Planchon, S., Sergeant, K., Renaut, J., Graça, J.A., Costa, G., Coelho, A.V., Ricardo, C.P. 2009. Proteomic evaluation of wound-healing processes in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber tissue. *Proteomics* 9: 4154–4175.
- Chen, L., Fincher, G.B., Høj, P.B. 1993. Evolution of polysaccharide hydrolase substrate specificity. Catalytic amino acids are conserved in barley 1,3-1,4- and 1,3- β -glucanases. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 13318–13326.
- Chen, S.Y. 1991. Injury of membrane lipid peroxidation to plant cell. *Plant Physiology Communications* 27: 84–90.
- Chen, W.P., Li, P.H., Chen, T.H.H. 2000. Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. *Plant, Cell and Environment* 23: 609–618.
- Chen, Y.T., Hsu, L.H., Huang, I.P., Tsai, T.C., Lee, G.C., Shaw, J.F. 2007. Gene cloning and characterization of a novel recombinant antifungal chitinase from papaya (*Carica papaya*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 714–722.
- Cheong, J.J., Birberg, W., Fügedi, P., Pilotti, A., Garegg, P.J., Hong, N., Ogawa, T., Hahn, M.G. 1991. Structure-activity relationships of oligo- β -glucoside elicitors of phytoalexin accumulation in soybean. *The Plant Cell* 3: 127–136.
- Cheong, Y.H., Kim, C.Y., Chun, H.J., Moon, B.C., Park, H.C., Kim, J.K., Lee, S., Han, C., Lee, S.Y., Cho, M.J. 2000. Molecular cloning of a soybean class III beta-1,3-glucanase gene that is regulated both developmentally and in response to pathogen infection. *Plant Science* 154: 71–81.
- Chiang, Y.J., Stushnoff, C., McSay, A.E., Jones, M.L., Bohnert, H.J. 2005. Overexpression of mannitol-1-phosphate dehydrogenase increases mannitol accumulation and adds protection against chilling injury in petunia. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130: 605–610.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, J.K. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science* 12: 444–451.
- Chinnusamy, V., Zhu, J.K., Sunkar, R. 2010. Gene regulation during cold stress acclimation in plants. *Methods in Molecular Biology* 639: 39–55.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., Staskawicz, B.J. 2006. Host–microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803–814.
- Chlan, C.A., Bourgeois, R.P. 2001. Class I chitinases in cotton (*Gossypium hirsutum*): Characterization, expression and purification. *Plant Science* 161: 143–154.
- Choi, S.Y., Gross, K.C. 1994. N-acetyl- β -d-glucosaminidase from ‘Golden Delicious’ apples. *Phytochemistry* 36: 1–6.
- Chou, Y.T., Yao, S., Czerwinski, R., Fleming, M., Krykbaev, R., Xuan, D., Zhou, H., Brooks, J., Fitz, L., Strand, J., Presman, E., Lin, L., Aulabaugh, A., Huang, X. 2006. Kinetic characterization of recombinant human acidic mammalian chitinase. *Biochemistry* 45: 4444–4454.
- Chow, P.S., Landhäusser, S.M. 2004. A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. *Tree Physiology* 24: 1129–1136.
- Christiansen, M.N., Ashworth, E.N. 1978. Prevention of chilling injury to seedling cotton with anti-transpirant. *Crop Science* 18: 907–908.
- Christie P.J., Alfenito, M.R., Walbot, V. 1994. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 194: 541–549.
- Churngchow, N., Suntaro, A., Wititsuwannnakul, R. 1995. β -1,3-Glucanase isoenzymes from the latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* 39: 505–509.
- Close, T.J. 1996. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum* 97: 795–803.

- Close, T.J. 1997. Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum* 100: 291-296.
- Cohen-Kupiec, R., Chet, I. 1998. The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology* 9: 270-277.
- Cole, M.D. 1994. Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays. A critical review. *Biochemical Systematics and Ecology* 22: 837-856.
- Collinge, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, J.D., Nielsen, K.K., Rasmussen, U., Vad, L. 1993. Plant chitinases. *The Plant Journal* 3: 31-40.
- Collins, T., Gerday, C., Feller, G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 3-23.
- Collins, T., Meuwis, M.A., Gerday, C., Feller, G. 2003. Activity, stability and flexibility in glycosidases adapted to extreme thermal environments. *Journal of Molecular Biology* 328: 419-428.
- Collins, T., Meuwis, M.A., Stals, I., Claeysens, M., Feller, G., Gerday, C. 2002. A novel family 8 xylanase: functional and physico-chemical characterization. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 35133-35139.
- Comabella M., Fernández, M., Martín, R., Rivera-Vallvé, S., Borrás, E., Chiva, C., Julià, E., Rovira A, Cantó, E., Alvarez-Cermeño, J.C., Villar, L.M., Tintoré, M., Montalban, X. 2010. Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis. *Brain* 133: 1082-1093.
- Concellón, A., Añón, M.C., Chaves, A.R., 2005. Effect of chilling on ethylene production in eggplant fruit. *Food Chemistry* 92, 63-69.
- Coombs, J., Brenchley J.E. 2001. Characterization of two new glycosyl hydrolases from the lactic acid bacterium *Carnobacterium piscicola* strain BA. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5094-5099.
- Cornish-Bowden, A., Cardenas, M.L. 1987. Co-operativity in monomeric enzymes. *Journal of Theoretical Biology* 124: 1-23.
- Côté F., Hahn, M.G. 1994. Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Molecular Biology* 26: 1379-1411.
- Côté, F., Cutt, J.R., Asselin, A., Klessig, D.F. 1991. Pathogenesis-related acidic β -1,3-glucanase genes of tobacco are regulated by both stress and developmental signals. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4: 173-181.
- Cotrell, J.E., Duffus, C.M., Paterson, L., Mackay, G.R., Allison, M.J., Bain, H. 1993. The effect of storage temperature on reducing sugars concentration and the activities of three amylolytic enzymes in tubers of the cultivated potato, *Solanum tuberosum* L. *Potato Research* 36: 107-117.
- Cotroneo, Z.V., Besoain, C.X. 1998. Aspectos epidemiológicos de *Botrytis cinerea* pers. en chirimoyos (*Annona cherimola*, Mill). Boletín micológico 13: 85-91.
- Crawford, D.L., Powers, D.A. 1992. Evolutionary adaptation to different thermal environments via transcriptional regulation. *Molecular Biology and Evolution* 9: 806-813.
- Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M. Anchordoguy, T.J. 1990. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* 27: 219-231.
- Cui, S., Huang, F., Wang, J., Ma, X., Cheng, Y., Liu, J. 2005. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics* 12: 3162-3172.
- D'Amico, S., Gerday, C., Feller, G. 2003. Activity-stability relationships in extremophilic enzymes. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 7891-7896.
- D'Amico, S., Gerday, C., Feller, G. 2004. Temperature adaptation of proteins: engineering mesophilic-like activity and stability in a cold-adapted alpha-amylase. *Journal of Molecular Biology* 332: 981-988.
- D'Angeli, S., Altamura, M.M. 2007. Osmotin induces cold protection in olive trees by affecting programmed cell death and cytoskeleton organization. *Planta* 225: 1147-1163.
- Dackman, C., Chet, I., Nordbring-Hertz, B. 1989. Fungal parasitism of the cyst nematode *Heterodera schachtii*: infection and enzymatic activity. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 201-208.
- Dancik, V., Addona, T.A., Clauser, K.R., Vath, J.E., Pevzner, P.A. 1999. *De novo* peptide sequencing via tandem mass spectrometry. *Journal of Computational Biology* 6: 327-342.

- Danhash, N., Wagemakers, C.A.M., van Kan, J.A.L., de Wit, P.J.G.M. 1993. Molecular characterization of four chitinase cDNAs obtained from *Cladosporium fulvum*-infected tomato. *Plant Molecular Biology* 22: 1017-1029.
- Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhamou, N., Sarhan, F. 1998. Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *The Plant Cell* 10: 623-638.
- Darby, N., Creighton, T.E. 1995. Disulfide bonds in protein folding and stability. *Methods in Molecular Biology* 40: 219-252.
- Dave, R.S., Mitra, R.K. 1998. A low temperature induced apoplastic protein isolated from *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry* 49: 2207-2213.
- Davies, G., Henrissat, B. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3: 853-859.
- Davletova, S., Schlauch, K., Coutu, J., Mittler, R. 2005. The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139: 847-856.
- De Boer, W., Gunnewiek, P.J.A.K., Lafeber, P., Janse, J.D., Spit, B.E., Woldendorp, F.W. 1998. Antifungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 193-203.
- De Jong, A.J., Heidstra, R., Spink, H.P., Hartog, M.V., Meijer, E.A., Hendriks, T., Lo Schiavo, F., Terzi, M., Bisseling, T., Van Kammen, A., De Vries, S.C. 1993. *Rhizobium* lipooligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. *The Plant Cell* 5: 615-620.
- De la Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J.M., Benitez, T., Pintor-Toro, J.A., Llobel, A. 1992. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Biochemistry* 206: 859-867.
- De los Reyes, B.G., Taliaferro, C.M., Anderson, M.P., Melcher, U., McMaugh, S. 2001. Induce expression of the class II chitinase gene during cold acclimation and dehydration of bermudagrass (*Cynodon sp.*). *Theoretical and Applied Genetics* 103: 297-306.
- De Tapia, M., Dietrich, A., Burkard, G. 1987. *In vitro* synthesis and processing of a bean pathogenesis-related (PR4) protein. *European Journal of Biochemistry* 166: 554-563.
- De Wit, P.J. 2007. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 2726-2732.
- Del Cura, B., Escribano, M.I., Zamorano, J.P., Merodio, C. 1996. High carbon dioxide delays postharvest changes in RuBPCase and polygalacturonase-related protein in cherimoya peel. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121: 735-739.
- Decoteau, D. 2004. *Principles of Plant Science. Environmental Factors and Technology in Growing Plants*. Pearson Education. pp. 432.
- Denby, K., Gehring, C. 2005. Engineering drought and salinity tolerance in plants: lessons from genome-wide expression profiling in *Arabidopsis*. *Trends in Biotechnology* 23: 547-552.
- Derckel, J., Legendre, L., Audran, J., Haye, B., Lambert, B. 1996. Chitinases of the grapevine (*Vitis vinifera* L.): five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. *Plant Science* 119: 31-37.
- Devavratha, H.R., Lalitha R.G. 2008. Abundant class III acidic chitinase homologue in tamarind (*Tamarindus indica*) seed serves as the major storage protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 2175-2182.
- DeVries, A.L. 1986. Antifreeze glycopeptides and peptides: interactions with ice and water. *Methods in Enzymology* 127: 293-303.
- DeVries, A.L., Cheng, C.H.C. 1992. The role of antifreeze glycopeptides and peptides in the survival of cold-water fishes. En: *Water and Life*. Somero, G.N., Osmond, C.B., Bolis, C.L. (eds.), Springer-Verlag, Berlin. pp: 301-315.
- Deytieux, C., Genyl, L., Lapaillerie, D., Claverol, S., Bonneau, M., Donèchel, B. 2007. Proteome analysis of grape skins during ripening. *Journal of Experimental Botany* 58: 1851-1862.
- Diamant, S., Rosenthal, D., Azem, A., Eliahu, N., Ben-Zvi, A.P., Goloubinoff, P. 2003. Dicarboxylic amino acids and glycine-betaine regulate chaperone-mediated protein-disaggregation under stress. *Molecular Microbiology* 49: 401-410.

- Díaz-Perales, A., Collada, C., Blanco, C., Sanchez-Monge, R., Carrillo, T., Aragoncillo, C., Salcedo, G. 1998. Class I chitinases with hevein-like domain, but not class II enzymes, are relevant chesnut and avocado allergens. *Journal of Allergy Clinical Immunology* 102: 127-33.
- Dickman, M. B. 1998. Anthracnose. En: *Papaya Diseases Caused by Fungi. Compendium of Tropical Fruit Diseases*. Ploetz, R. C., Zentmyer, G. A., Nishijima, W. T., Rohrbach, K. G., Ohr, H. D. (eds), American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA. pp: 58–59.
- Dicko, M.H., Searle-van Leeuwen, M.J., Traore, A.S., Hilhorst, R., Beldman, G.. 2001. Polysaccharide hydrolases from leaves of *Boscia senegalensis*: properties of endo-(1→3)-beta-D-glucanase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 94: 225-241.
- Ding, C.K., Wang, C.Y., Gross, K.C., Smith, D.L. 2001. Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat shock proteins in tomato fruit by methyl jasmonate and methyl salicylate. *Plant Science* 161: 1153–1159.
- Ding, C.K., Wang, C.Y., Gross, K.C., Smith, D.L. 2002. Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta* 214: 895–901.
- Domingo, C., Conejero, V., Vera, P. 1994. Genes encoding acidic and basis class III β -1,3-glucanases are expressed in tomato plants upon viroid infection. *Plant Molecular Biology* 24: 725-732.
- Dong, L., Lurie, S., Zhou, H.W. 2002. Effect of 1-methylcyclopropene on ripening of ‘Canino’ apricots and ‘Royal Zee’ plums. *Postharvest Biology and Technology* 24: 135–145.
- Donzelli, B.G.G., Harman, G.E. 2001. Interaction of ammonium, glucose, and chitin regulates the expresión of cell wall-degrading enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5643-5647.
- Dopico, B., Lowe, A.L., Wilson, I.D., Merodio, C., Grierson, D. 1993. Cloning and characterization of avocado fruit messenger-RNAs and their expression during ripening and low-temperature storage. *Plant Molecular Biology* 21: 437-449.
- Dubey, R.S., Rani, M. 1987. Proteases and proteins in germinating rice seeds in relation to salt tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry* 14: 172-182.
- Duo-Chuan, L.I., Chen, S., Jing, L.U. 2005. Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus *Talaromyces flavus*. *Mycopathologia* 159: 223-229.
- Dygert, S., Li, L.H., Florida, D., Thoma, J.A. 1969. Determination of reducing sugar with improved precision. *Analytical Biochemistry* 13: 367-374.
- Ecker, J.R. 1995. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* 268: 667-675.
- Ekramoddoullah, A.K.M., Taylor, D., Hawkins, B.J. 1995. Characterization of a fall protein of sugar pine and detection of its homologue associated with frost hardiness of western white pine needles. *Canadian Journal of Forest Research* 25: 1137–1147.
- Ekramoddoullah, A.K.M., Yu, X., Sturrock, R., Zamani, A., Taylor, D. 2000. Detection and seasonal expression pattern of a pathogenesis-related protein (PR-10) in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) tissues. *Physiologia Plantarum* 110: 240–247.
- El Ghaouth, A., Wilson, C.L., Callahan, A.M. 2003. Induction of chitinase, β -1,3-glucanase, and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-C treatment. *Phytopathology* 93: 349-355.
- El Ouakfaoui, S., Asselin, A. 1992. Multiple forms of chitosanase activities. *Phytochemistry* 31: 1513-1518.
- Ensminger, I., Busch, F. Huner, N.P.A. 2006. Photostasis and cold acclimation: Sensing low temperature through photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 126: 28–44.
- Eppe, P., Apel, K., Bohlmann, H. 1995. An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiology* 109: 813-820.
- Escribano M.I., Legaz, M.E. 1988. High performance liquid chromatography of the dansyl derivatives of putrescine, spermidine and spermine. *Plant Physiology* 87: 519-522.
- Escribano, M.I., Aguado, P., Reguera, R.M., Merodio, C. 1996. Conjugated polyamine levels and putrescine synthesis in cherimoya fruit during storage at different temperatures. *Journal of Plant Physiology* 147: 736-742.

- Escribano, M.I., Cura, B. del, Muñoz, T., Merodio, C. 1997. The effect of high carbon dioxide at low temperature on ribulose 1,5-biphosphate carboxylase and polygalacturonase protein levels in cherimoya fruit. *American Society for Horticultural Science* 122: 258-262.
- Escribano, M.I., Merodio, C. 1994. Relevance of polyamine levels in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) fruit ripening. *Journal of Plant Physiology* 143: 207-212.
- Evans, D.E. 2004. Programmed cell death in response to abiotic stress. En: *Programmed cell death in plants*. Gray, J. (ed.), CRC Press, Ohio. pp: 1-20.
- Ewart, K.V., Lin, Q., Hew, C.L. 1999. Structure, function and evolution of antifreeze proteins. *Cellular and Molecular Life Science* 55: 271-283.
- Exama, A., Arul, J., Lencki, R.W., Lee, L.Z., Toupin, C. 1993. Suitability of plastic films for modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Journal of Food Science* 58: 1365-1370.
- Ezz, T.M., Ritenour, M.A., Brecht, J.K. 2004. Hot water and elevated CO₂ effects on proline and other compositional changes in relation to postharvest chilling injury of 'Marsh' grapefruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 129: 576-582.
- Fallik, E. 2004. Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing). *Postharv Biol Technol* 32:125-134.
- Farber, J.M. 1991. Microbiological aspects of modified atmosphere packaging-a review. *Journal of Food Protection* 54: 58-70.
- Farré, J.M., Hermoso, J.H. 1997. "El Chirimoyo en España." En: *Anonáceas: Produção e Mercado (Pinha, Graviola, Atemóia e Cherimólia)*. São José, A.R., Boas, I.V., Morais, O.M., Rebouças T.N.H. (eds.), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Depto de Fitotecnia e Zootecnia, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. pp: 84-87.
- Faust, M., Wang, S. 1992. Polyamines in horticulturally important plants. *Horticultural Reviews* 14: 333 - 356.
- Felix, G., Meins, F.Jr. 1986. Developmental and hormonal regulation of β -1,3-glucanase in tobacco *Nicotiana tabacum* cultivar Havana 425. *Planta* 167: 206-211.
- Felle, H.H. 2001. pH: Signal and Messenger in Plant Cells. *Plant Biology* 3: 577-591.
- Feller, G. 2003. Molecular adaptations to cold in psychrophilic enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60: 648-662.
- Feller, G., Gerday, C. 2003. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nature Reviews Microbiology* 1: 200-208.
- Feller, G., D'Amico, D., Gerday, C. 1999. Thermodynamic Stability of a Cold-Active α -Amylase from the Antarctic Bacterium *Alteromonas haloplantis*. *Biochemistry* 38: 4613-4619.
- Feller, G., Gerday, C. 1997. Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 53: 830-841.
- Felse, P.A., Panda, T. 1999. Regulation and cloning of microbial chitinase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: 141-151.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17: 368-376.
- Feng, Z., Guo, A., Feng, Z. 2003. Amelioration of chilling stress by triadimefon in cucumber seedlings. *Plant growth regulation* 39: 277-283.
- Fenice, M., Selbmann, L., Giambattista, D., Federici, F. 1998. Chitinolytic activity at low temperature of an Antarctic strain (A3) of *Verticillium lecanii*. *Research in Microbiology* 149: 289-300.
- Ferguson, I., Volz, R., Woolf, A. 1999. Preharvest factors affecting physiological disorders of fruit. *Postharvest Biology and Technology* 15: 255-262.
- Fernandez-Caballero, C., Romero, I., Goñi, O., Escribano, M.I., Merodio, C., Sanchez-Ballesta, M.T. 2009. Characterization of an Antifungal and Cryoprotective Class I Chitinase from Table Grape Berries (*Vitis vinifera* Cv. Cardinal). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 8893-8900.

- Fernández-Trujillo, J.P., Artés, F. 1997. Keeping quality of cold stored peaches using intermittent warming. *Food Research International* 30: 441-450.
- Fersht, A. 1985. *Enzyme structure and mechanism*. Freeman, W.H. (ed.), New York. pp. 475.
- Feys, B.J., Parker, J.E. 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetic* 16: 449-455.
- Fields, P.A., Somero, G.N. 1998. Hot spots in cold adaptation: localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A(4) orthologs of Antarctic notothenioid fishes. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 11476-11481.
- Fincher, G.B., Stone, B.A. 1993. Physiology and biochemistry of germination in barley. En: *Barley: chemistry and technology*. MacGregor, A.W., Bhatti, R.S. (eds.), StPaul, AACC, American Association of Cereal Chemists. pp: 247-295.
- Fincher, G.B. 1989. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 305-346.
- Flach, J., Pilet, P.E., Jollès, P. 1992. What's new in chitinase research?. *Experientia* 48: 701-716.
- Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9: 275-296.
- Flores, A., Grau, A., Laurich, F., Dorffling, K. 1988. Effects of new terpenoid analogues of abscisic acid on chilling and freezing resistances. *Journal of Plant Physiology* 132: 362-363.
- Flores, H.E. 1991. Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. En: *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. Slocum, R.D., Flores, H.E. (eds.), CRC Press, Boca Raton. pp: 213-229.
- Fluhr, R., Mattoo, A.K. 1996. Ethylene-biosynthesis and perception. *Critical Reviews in Plant Sciences* 15: 479-523.
- Fouqué, A. 1972. Espèces Fruitières d'Amérique Tropicale. *Fruits* 27: 62-72.
- Friedman, S.J., Skehan, P. 1980. Membrane-active drugs potentiate the killing of tumor cells by D-glucosamine. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77: 1172-1176.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 436-442.
- Fukamizo, T. 2000. Chitinolytic enzymes: Catalysis, substrate binding, and their Application. *Current Protein and Peptide Science* 1: 105-124.
- Fukamizo, T., Kramer, K.J. 1985a. Mechanism of chitin oligosaccharide hydrolysis by the binary chitinase system in insect moulting fluid. *Insect Biochemistry* 15: 1-7.
- Fukamizo, T., Kramer, K.J. 1985b. Mechanism of chitin hydrolysis by the binary chitinase system in insect moulting fluid. *Insect Biochemistry* 15: 141-145.
- Fukamizo, T., Fleury, A., Côte, N., Mitsutomi, M., Brzezinski, R. 2006. Exo- β -D-glucosaminidase from *Amycolatopsis orientalis*: catalytic residues, sugar recognition specificity, kinetics, and synergism. *Glycobiology* 16: 1064-1072.
- Fukamizo, T., Sasaki, C., Schelp, E., Bortone, K., Robertus, J.D. 2001. Kinetic properties of chitinase-1 from the fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *Biochemistry* 40: 2448-2454.
- Fung, R.W., Wang, C.Y., Smith, D.L., Gross, K.C., Tian, M. 2004. MeSA and MeJA increase steady-state transcript levels of alternative oxidase and resistance against chilling injury in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science* 166: 711-719.
- Gai, Y.P., Li, X.Z., Ji, X.L., Wu, C.A., Yang, G.D., Zheng, C.C. 2008. Chilling stress accelerates degradation of seed storage protein and photosynthetic protein during cotton seed germination. *Journal of Agronomy and Crop Science* 194: 278-288.
- Galli, F., Archbold, D.D., Pomper, K.W. 2008. Loss of ripening capacity of pawpaw fruit with extended cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 10683-10688.
- Galston, A.W., Sawhney, R.K., 1990. Polyamines in plant physiology. *Plant Physiology* 94: 406-410.

- García-Casado, G., Collada, C., Allona, I., Soto, A., Casado, R., Rodríguez-Cerezo, E., Gomez, L., Aragoncillo, C. 2000. Characterization of an apoplastic basic thaumatin-like protein from recalcitrant chestnut seeds. *Physiologia Plantarum* 110: 172–180.
- García-García, F., Schmelzer, E., Hahlbrock, K., Roxby, R. 1994. Differential expression of chitinase and β -1,3-glucanase genes in various tissues of potato plants. *Zeitschrift für Naturforschung C-A Journal of Biosciences* 49: 195–203.
- García-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., Moreno, M. 1995. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends in Microbiology* 3: 72–74.
- Gardiazábal, F., Rosenberg, G. 1993. *El cultivo del chirimoyo*. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía, Quillota, Chile. pp. 145.
- Garrigue-Antar, L., Hartigan, N., Kadler, K.E. 2002. Posttranslational modification of bone morphogenetic protein-1 is required for secretion and stability of the protein. *The Journal of Biological Chemistry* 45: 43327–43334.
- Gattiker, A., Bienvenut, W.V., Bairoch, A., Gasteiger, E. 2002. FindPept, a tool to identify unmatched masses in peptide mass fingerprinting protein identification. *Proteomics* 2: 1435–1444.
- Gaudet, D.A., Laroche, A., Frick, M., Davoren, J., Puchalski, B., Ergon, Å. 2000. Expression of plant defence-related (PR-protein) transcripts during hardening and dehardening of winter wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 15–24.
- Gaudet, D.A., Laroche, A., Frick, M., Huel, R., Puchalski, B. 2003a. Plant development affects the cold-induced expression of plant defence-related transcripts in winter wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 175–184.
- Gaudet, D.A., Laroche, A., Frick, M., Huel, R., Puchalski, B. 2003b. Cold induced expression of plant defensin and lipid transfer protein transcripts in winter wheat. *Physiologia Plantarum* 117: 195–205.
- Gegenheimer, P. 1990. Preparation of extracts from plants. *Methods in Enzymology* 182: 174–193.
- Georlette, D., Blaise, V., Collins, T., D'Amico, S., Gratia, E., Hoyoux, A., Marx, J.C., Sonan, G., Feller, G., Gerday, C. 2004. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiology Reviews* 28: 25–42.
- Georlette, D., Damien, B., Blaise, V., Gerday, C., Depiereux, E., Feller, G. 2003. Structural and functional adaptations to extreme temperatures in psychrophilic, mesophilic and thermophilic DNA-ligase. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 37015–37023.
- Gepstein, S., Sabehi, G., Carp, M.J., Hajouj, T., Nesher, M.F., Yariv, I., Dor, C., Bassani, M. 2003. Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *The Plant Journal* 36: 629–642.
- Gerhardt, L.B.A., Sachetto-Martins, G., Contarini, M.G., Sandroni, M., Ferreira, R.P., de Lima, V.M., Cordeiro, M.C., de Oliveira, D.E., Margis-Pinheir, M. 1997. *Arabidopsis thaliana* class IV chitinase is early induced during the interaction with *Xanthomonas campestris*. *FEBS Letters* 419: 69–75.
- Geurts, R., Franssen, H. 1996. Signal transduction in *Rhizobium* induced nodule formation. *Plant Physiology* 112: 447–453.
- Ghasemnezhad, M., Marsh, K., Shilton, R., Babalar, M., Woolf, A. 2008. Effect of hot water treatments on chilling injury and heat damage in 'Satsuma' mandarins: antioxidant enzymes and vacuolar ATPase, and pyrophosphatase. *Postharvest Biology and Technology* 48: 364–371.
- Gijzen, M., Kuflu, K., Qutob, D., Chernys, J.T. 2001. A class I chitinase from soybean seed coat. *Journal of Experimental Botany* 52: 2283–2889.
- Gilbert, G.A., Michelle, V.G., Wilson, C., Madore, M.A. 1998. Amino acid accumulation in sink and source tissues of *Coleus blumei* Benth. during salinity stress. *Journal of Experimental Botany* 49: 107–114.
- Gill, J., Rixon, J.E., Bolam, D.N., McQueen-Mason, S., Simpson, P.J., Williamson, M.P., Hazlewood, G.P., Gilbert, H.J. 1999. The type II and X cellulose-binding domains of *Pseudomonas* xylanase A potentiate catalytic activity against complex substrates by a common mechanism. *Biochemical Journal* 342: 473–480.
- Gilmour, S.J., Hajela, R.K., Thomashow, M.F. 1988. Cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 87: 745–750.
- Giordani, R., Benyahia, S., Teissere, M., Noat, G. 1992. Purification and properties of N-acetyl- β -D-glucosaminidase from *Hevea brasiliensis* latex. *Plant Science* 84: 25–34.

- Giovannoni, J.J. 2004. Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. *The Plant Cell* 16: S170–S180.
- Giri, A.P., Harsulkar, A.M., Patankar, A.G., Gupta, V.S., Sainani, M.N., Deshpande, V.V., Ranjekar, P.K. 1998. Association of induction of protease and chitinase in chickpea roots with resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Plant Pathology* 47: 693–699.
- Giribaldi, M., Perugini, I., Sauvage, F.X., Schubert, A. 2007. Analysis of protein changes during grape berry ripening by 2-DE and MALDI-TOF. *Proteomics* 7: 3154–3170.
- Glazebrook, J. 2001. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*-2001 status. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 301–308.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205 – 227.
- Göhre, V., Robatzek, S. 2008. Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology* 46: 189–215.
- Gokmen, V., Artik, N., Acar, J., Kahraman, N., Poyrazoglu, E. 2001. Effects of various clarification treatments on patuling, phenolic compound and organic acid compositions of apple juice. *European Food Research and Technology* 213: 194–199.
- Goldstein, I.S., Hay, G.W., Lewis, B.A., Smith, F. 1965. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation reduction and hydrolysis. En: *Methods in carbohydrate chemistry*. Whistler, R. L. (ed.), vol. 5, Academic Press, New York. pp: 361–370.
- Gómez, L., Allona, I., Casado, R., Aragoncillo, C. 2002. Seed chitinases. *Seed Sciences Research* 12: 217–230.
- Gong, M., Liu, Y.L., Zhu, P.R. 1989. Changes of proteins and free amino acids in leaves of rice seedlings during chilling stress. *Plant Physiology Communications* 26: 18–22.
- Goñi, O., Escribano, M.I., Merodio, C. 2008. Gelatinization and retrogradation of native starch from cherimoya fruit during ripening, using differential scanning calorimetry. *LWT - Food Science and Technology* 41: 303–310.
- Goñi, O., Muñoz, M., Cabello, J.R., Escribano, M.I., Merodio, C. 2007. Changes in water status of cherimoya fruit during ripening. *Postharvest Biology and Technology* 45: 147–150.
- Goñi, O., Sanchez-Ballesta, M.T., Escribano, M.I., Merodio, C. 2009. Regulation of defence and cryoprotective proteins by high levels of CO₂ in *Annona* fruit stored at chilling temperature. *Journal of Plant Physiology* 166: 246–258.
- Goñi, O., Sanchez-Ballesta, M.T., Merodio, C., Escribano, M.I. 2010. Ripening-related defense proteins in *Annona* fruit. *Postharvest Biology and Technology* 55: 169–173.
- Goñi, O., Sanchez-Ballesta, M.T., Merodio, C., Escribano, M.I. 2010. Potent cryoprotective activity of cold and CO₂-regulated cherimoya (*Annona cherimola*) endochitinase. *Journal of Plant Physiology* (en prensa).
- González-Aguilar, G.A., Tiznado-Hernandez, M.E., Zavaleta-Gatica, R., Martinez-Tellez, M.A. 2004. Methyl jasmonate treatments reduce chilling injury and activate the defense response of guava fruits. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313: 694–701.
- González-Aguilar, G.A., Zacarias, L., Lafuente, M.T. 1998. Ripening affects high temperature-induced polyamines and their changes during cold storage of hybrid fortune mandarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 3503–3508.
- González-Aguilar, G.A., Zacarias, L., Mulas, M., Lafuente, M.T. 1997. Temperature and duration of water dips influence chilling injury, decay and polyamine content in 'Fortune' mandarins. *Postharvest Biology and Technology* 12: 61–69.
- González-Aguilar, G.A., Zacarias, L., Perez-Amador, M.A., Carbonell, J., Lafuente, M.T. 2000. Polyamine content and chilling susceptibility are affected by seasonal changes in temperature and by conditioning temperature in cold-stored 'Fortune' mandarin fruit. *Physiologia Plantarum* 108: 140–146.
- Gooday, G.W. 1990. The ecology of chitin degradation. *Advances in Microbial Ecology* 11: 387–430.
- Goormachtg, S., de Velde, W.V., Lievens, S., Verplancke, C., Herman, S., Keyser, A.D., Holsters, M. 2001. Srchi24, A chitinase homolog lacking an essential glutamic acid residue for hydrolytic activity, is induced during nodule development on *Sesbania rostrata*. *Plant Physiology* 127: 78–89.

- Goormachtig, S., Lievens, S., Van de Velde, W., Van Montagu, M., Holsters, M. 1998. Srchi13, a novel early nodulin from *Sesbania rostrata*, is related to acidic class III chitinases. *The Plant Cell* 10: 905-915.
- Graham, L.S., Sticklen, M.B. Plant chitinases. 1994. *Canadian Journal of Biology* 72: 1057-1083.
- Graham, M.Y. 2005. The diphenylether herbicide lactofen induces cell death and expression of defense-related genes in soybean. *Plant Physiology* 139: 1784-1794.
- Grant, J.J., Loake, G.J. 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology* 124: 21-29.
- Gray, J. 2004. Paradigms of the evolution of programmed cell death. En: *Programmed cell death in plants*. Gray, J. (ed.), CRC Press, Ohio. pp: 1-20.
- Green, T.R., Ryan, C.A. 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* 175: 776-777.
- Griffin, D.H. 1994. *Fungal Physiology*. 2ª ed, Wiley-Liss, Nueva York. pp. 472.
- Griffith, M., Brown, B.N. 1982. Cell wall deposits in winter rye *Secale cereale* L. 'Puma' during cold acclimation. *Botanical Gazette* 143: 486-490.
- Griffith, M., Ala, P., Yang, D.S.C., Hon, W.C., Moffatt, B.A., 1992. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. *Plant Physiology* 100: 593-596.
- Griffith, M., Antikainen, M., Hon, W.C., Pihakaski-Maunsbach, K., Yu, X.M., Chun, J.U., Yang, D.S.C. 1997. Antifreeze proteins in winter rye. *Physiologia Plantarum* 100: 327-332.
- Griffith, M., Yaish, M. W. 2004. Antifreeze proteins in overwintering plants: A tale of two activities. *Trends in Plant Science* 9: 399-405.
- Griffiths, J., Black, J. 1987. Separation and identification of alkaline phosphatase isoenzymes and isoforms in serum of healthy persons by isoelectric focusing. *Clinical chemistry* 33: 2171-2177.
- Grondin, M., Hamel, F., Averill-Bates, D.A., Sarhan, F. 2009. Wheat proteins improve cryopreservation of rat hepatocytes. *Biotechnology and Bioengineering* 15: 582-591.
- Guan, Y., Ramalingam, S., Nagegowda, D., Taylor, P.W.J., Chye, M.L. 2008. *Brassica juncea* chitinase BjCHI1 inhibits growth of fungal phytopathogens and agglutinates Gram-negative bacteria. *Journal of Experimental Botany* 59: 3475-3484.
- Guevara, M.G., Oliva, C.R., Machinaadiarena, M., Daleo, G.R. 1999. Purification and properties of an aspartic protease from potato tuber that is inhibited by a basic chitinase. *Physiologia Plantarum* 106: 164-169.
- Gupta, D.S. 2007. Plasma membrane ultrastructure in embryogenic cultures of orchardgrass during NaCl stress. *Biologia plantarum* 51: 759-763.
- Gusta, L.V., Wisniewski, M., Nesbitt, N.T., Gusta, M.L. 2004. The effect of water, sugars, and proteins on the pattern of ice nucleation and propagation in acclimated and nonacclimated canola leaves. *Plant Physiology* 135: 1642-1653.
- Gutierrez, M., Sola, M., Pascual, L., Vargas, A.M. 1994. Postharvest changes of sugar concentration in chilled-injured cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Journal of Plant Physiology* 143, 27-32.
- Gutierrez, M., Sola, M.M., Pascual, L., Rodríguez-García, M.I., Vargas, A.M. 1992. Ultrastructural changes in cherimoya fruit injured by chilling. *Food Structure* 11: 323-332.
- Guye, M.G., Vigh, L., Wilson, J.M. 1986. Polyamine titre in relation to chill-sensitivity in *Phaseolus* sp. *Journal of Experimental Botany* 37: 1036-1043.
- Ha, H., Sirisoma, N., Kuppusamy, P., Zweier, J., Woster, R., Casero, R. 1998. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 11140-11145.
- Hadacek, F., Greger, H. 2000. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis* 11: 137-147.
- Hahn, M., Hennig, M., Schlesier, B., Höhne, W. 2000. Structure of jack bean chitinase. *Acta Crystallographica Section D* 56: 1096-1099.

- Hahn, M., Walbot, V. 1989. Effects of cold treatment on protein synthesis and mRNA levels in rice leaves. *Plant Physiology* 91: 930-938.
- Hakala, B.E., White, C., Recklies, A.D. 1993. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 25803-25810.
- Hall, J.L., Flowers, T.J. 1973. The effect of salt on protein synthesis in the halophyte *Suaeda maritima*. *Planta* 110: 361-368.
- Hamel, F., Bellemere, G. 1995. Characterisation of a class I chitinase gene and of wound-inducible, root and flower-specific chitinase expression in *Brassica napus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1263: 212-220.
- Hamel, F., Boivin, R., Temblay, C., Bellemare, G. 1997. Structural and evolutionary relationships among chitinases of flowering plants. *Journal of Molecular Evolution* 44: 614-624.
- Hammond-Kosack, K.N., Jones, J.D.G. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8: 1773-1791.
- Hanfrey, C., Fife, M., Buchanan-Wollaston, V. 1996. Leaf senescence in *Brassica napus*: expression of genes encoding pathogenesis-related protein. *Plant Molecular Biology* 30: 597-609.
- Hannah, M.A., Heyer, A.G., Hinch, D.K. 2005. A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* 1: e26.
- Hara, M., Terashima, S., Kuboi, T. 2001. Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. *Journal of Plant Physiology* 158: 1333-1339.
- Hara, M., Wakasugi, Y., Ikoma, Y., Yano, M., Ogawa, K., Kuboi, T. 1999. cDNA sequence and expression of a cold-responsive gene in *Citrus unshiu*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 63: 433-437.
- Hardenburg, R.E., Watada, A.E., Wang, C.Y. 1990. *The commercial storage of fruits vegetables and florist and nursery stocks*. Gross, K.C., Wang, C.Y., Saltveit, M. (eds.), Agricultural Handbook 66, Ed. USDA, Washington. pp. 130.
- Hare, P.D., Cress, W.A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21: 79-102.
- Harman, G.E., Hayes, K.E., Lorito, M., Broadway, R.M., Di Pietro, A., Peterbauer, C., Tronsmo, A. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitinase and endochitinase. *Molecular Plant Pathology* 83: 313-318.
- Hart, C.M., Nagy, F., Meins, F.J. 1993. A 61 bp enhancer element of the tobacco β -1,3-glucanase B gene interacts with one or more regulated nuclear proteins. *Plant Molecular Biology* 21: 121-131.
- Hart, P.J., Pfluger, H.D., Monzingo, A.F., Hollis, T., Robertus, J.D. 1995. The refined crystal structure of an endochitinase from *Hordeum vulgare* L. seeds at 1.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 248: 402-413.
- Hashimoto, M., Komatsu, S. 2007. Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress. *Proteomics* 7:1293-302.
- Hatano, N., Hamada, T. 2008. Proteome analysis of pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Journal of Proteome Research* 7: 809-816.
- Havaux, M., Niyogi, K.K. 1999. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 8762-8767.
- He, D.Y., Yazaki, Y., Nishiawa, Y., Takai, R., Yamada, K., Sakano, K., Shibuya, N., Minami, E. 1998. Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the potent elicitor, N-acetylchitoheptaose. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 1167-1174.
- Helleboid, S., Bauw, G., Belingheri, L., Vasseur, J., Hilbert, J.L. 1998. Extracellular β -1,3-glucanases are induced during early somatic embryogenesis in *Cichorium*. *Planta* 205: 56-63.
- Helleboid, S., Hendriks, T., Bauw, G., Inzé, D., Vasseur, J., Hilbert, J.L. 2000. Three major somatic embryogenesis related proteins in *Cichorium* identified as PR proteins. *Journal of Experimental Botany* 51: 1189-1200.
- Henning, J., Dewey, R.E., Cutt, J.R., Klessig, D.F. 1993. Pathogen, salicylic acid and developmental dependent expression of β -1,3-glucanase/GUS gene fusion in transgenic tobacco plants. *The Plant Journal* 4: 481-493.

- Henrissat, B., Callebaut, I., Fabrega, S., Lehn, P., Mornon, J.P., Davies, G. 1995. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 7090-7094.
- Henrissat, B., Bairoch, A. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid-sequence similarities. *Biochemical Journal* 293: 781-788.
- Herbers, K., Monke, G., Badur, R., Sonnewald, U. 1995. A simplified procedure for the subtractive cDNA cloning of photoassimilate-responding genes: Isolation of cDNAs encoding a new class of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* 29: 1027-1038.
- Heredia, V.V., Thomson J., Nettleton D., Sun S. 2006. Glucose-induced conformational changes in glucokinase mediate allosteric regulation: transient kinetic analysis. *Biochemistry* 45: 7553-7562.
- Heywood, V. H. 1993. *Flowering Plants of the World*. Heywood, V.H. (ed.), Oxford University Press, New York. pp. 335.
- Hiilovaara-Teijo, M., Hannukkala, A., Griffith, M., Yu, X.M., Pihakaski-Maunsbach, K. 1999. Snow-mold-induced apoplastic proteins in winter rye leaves lack antifreeze activity. *Plant Physiology* 121: 665-674.
- Hincha, D.K., Meins, F., Schmitt, J.M. 1997. β -1,3-glucanase is cryoprotective in vitro and is accumulated in leaves during cold acclimation. *Plant Physiology* 114: 1077-1083.
- Hincha, D.K., Neukamm, B., Srór, H.A., Sieg, F., Weckwarth, W., Rückels, M., Lullien-Pellerin, V., Schröder, W., Schmitt, J.M. 2001. Cabbage cryoprotectin is a member of the nonspecific plant lipidtransfer protein gene family. *Plant Physiology* 125: 835-846.
- Hiramatsu, S., Ishihara, M., Fujie, M., Usami, S., Yamada, T. 1999. Expression of a chitinase gene and lysis of the host cell wall during *Chlorella virus* CVK2 infection. *Virology* 260: 308-315.
- Hitz, W.D., Hanson, A.D. 1980. Determination of glycinebetaine by pyrolysis-gas chromatography in cereals and grasses. *Phytochemistry* 19: 2371-2374.
- Hjernø, K., Alm, R., Canback, B., Matthiesen, R., Trajkovski, K., Bjork, L., Roepstorff, P., Emanuelsson, C. 2006. Down-regulation of the strawberry Bet v 1-homologous allergen in concert with the flavonoid biosynthesis pathway in colorless strawberry mutant. *Proteomics* 6: 1574-1587.
- Ho, V.S.M., Ng, T.B. 2007. Chitinase-like proteins with antifungal activity from Emperor banana fruits. *Protein and Peptide Letters*. 14: 828-831.
- Hodge, A., Gooday, G.W., Alexander, I.J. 1996. Inhibition of chitinolytic activities from tree species and associated fungi. *Phytochemistry* 41: 77-84.
- Hodge, A., Alexander, I.J., Gooday, G.W. 1995. Chitinolytic enzymes of pathogenic and ectomycorrhizal fungi. *Mycological Research* 99: 935-941.
- Hodge, A., Alexander, I.J., Gooday, G.W. 1995. Chitinolytic activities of *Eucalyptus pilularis* and *Pinus sylvestris* root systems challenged with mycorrhizal and pathogenic fungi. *New Phytologist* 131: 255-261.
- Hodges, M. 2003. Overview: oxidative stress and postharvest produce. En: *Postharvest oxidative stress in horticultural crops*. Hodges, M. (ed.), Food Products Press, USA. pp: 1-12.
- Hoell, I.A., Dalhus, B., Heggset, E.B., Aspino, S.I., Eijsink, V.G. 2006. Crystal structure and enzymatic properties of a bacterial family 19 chitinase reveal differences from plant enzymes. *FEBS Journal* 273: 4889-4900.
- Høj, P.B., Fincher, G.B. 1995. Molecular evolution of plant β -glucan endohydrolases. *The Plant Journal* 7: 367-379.
- Holland, N., Menezes, H.C., Lafuente, M.T. 2002. Carbohydrates as related to the heat-induced chilling tolerance and respiratory rate of Fortune mandarin fruit harvested at different maturity stages. *Postharvest Biology and Technology* 25: 181-191.
- Holland, N., Menezes, H.C., Lafuente, M.T. 2005. Carbohydrate metabolism as related to high-temperature conditioning and peel disorders occurring during storage of citrus fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8790-8796.
- Hollis, T., Honda, Y., Fukamizo, T., Marcotte, E., Day, P.J., Robertus, J.D. 1997. Kinetic analysis of barley chitinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 344: 335-342.

- Hon, W.C., Griffith, M., Mlynarz, A., Kwok, Y.C., Yang, D.S. 1995. Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis related proteins. *Plant Physiology* 109: 879–889.
- Hon, W.C., Griffith, M., Chong, P., Yang, D.S.C. 1994. Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Plant Physiology* 3: 971–980.
- Honda, Y., Kitaoka, M., Tokuyasu, K., Sasaki, C., Fukamizo, T., Hayashi, K. 2003. Kinetic studies on the hydrolysis of N-acetylated and N-deacetylated derivatives of 4-methylumbelliferyl chitobioside by the family 18 chitinases ChiA and ChiB from *Serratia marcescens*. *The Journal of Biochemistry* 133: 253–258.
- Honda, Y., Tanimori, S., Kiriata, M., Kaneko, S., Tokuyasu, K., Hashimoto, M., Watanabe, T., Fukamizo, T. 2000. Kinetic analysis of the reaction catalyzed by chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 toward the novel substrates, partially N-deacetylated 4-methylumbelliferyl chitobiosides. *FEBS Letters* 476: 194–197.
- Horsch, M., Mayer, C., Sennhauser, U., Rast, D.M. 1997. β -N-acetylhexosaminidase: a target for the design of antifungal agents. *Pharmacology and Therapeutics* 76: 187–218.
- Hou, W.C., Chen, Y.C., Lin, Y.H. 1998. Chitinase activity of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.], var. Tainong 57). *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 39: 93–97.
- Houde, M., Daniel, C., Lachapelle, M., Allard, F., Laliberté, J., Sarhan, F. 1995. Immunolocalization of freezing-tolerance associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *The Plant Journal* 8: 583–593.
- Howard, M.B., Ekborg, N.A., Taylor II, L.E., Weiner, R.M., Hutcheson, S.W. 2004. Chitinase B of *Microbulbifer degradans* 2-40 contains two catalytic domains with different chitinolytic activities. *Journal of Bacteriology* 186: 1297–1303.
- Howe, G.A., Jander, G. 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology* 59: 41–66.
- Hrmova, M., Fincher, G.B. 1993. Purification and properties of three (1-3)- β -D-glucanase isoenzymes from young leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *Biochemical Journal* 289: 453–461.
- Hsiao, T.C. 1973. Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology* 24: 519–570.
- Hsieh, T.H., Lee, J.T., Yang, P.T., Chiu, L.H., Charng, Y.Y., Wang, Y.C., Chan, M.T. 2002. Heterology expression of the *Arabidopsis* C repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiology* 129: 1086–1094.
- Hückelhoven, R. 2007. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology* 45: 101–127.
- Huet, J., Rucktooa, P., Clantin, B., Azarkan, M., Looze, Y., Villeret, V., Wintjens, R. 2008. X-ray structure of papaya chitinase reveals the substrate binding mode of glycosyl hydrolases family 19 chitinases. *Biochemistry* 47: 8283–8291.
- Huner, N.P.A., Palta, J.P., Li, P.H., Carter, J.V. 1981. Anatomical changes in leaves of Puma rye in response to growth at cold-hardening temperatures. *Botanical Gazette* 142: 55–62.
- Hung, T.H., Chang, Y.M., Sung, H.Y., Chang, C.T. 2002. Purification and characterization of hydrolase with chitinase and chitosanase activity from commercial stem bromelain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 4666–4673.
- Huston, A.L., Haeggström, J.Z., Feller, G. 2008. Cold adaptation of enzymes: structural, kinetic and microcalorimetric characterizations of an aminopeptidase from the Arctic psychrophile *Colwellia psychrerythraea* and of human leukotriene A₄ hydrolase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1784: 1865–1872.
- Hwang, B.K., Sunwoo, J.Y., Kim, Y.J., Kim, B.S. 1997. Accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL- β -amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51: 305–322.
- Imin, N., de Jong, F., Mathesius, U., van Noorden, G., Saeed, N.A., Wang, X.D., Rose, R.J., Rolfe, B.G. 2004. Proteome reference maps of *Medicago truncatula* embryogenic cell cultures generated from single protoplasts. *Proteomics* 4: 1883–1896.
- Ingram, J., Bartels, D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 377–403.

- Inui, H., Yamaguchi, Y., Hirano, S. 1997. Elicitor actions of N-acetylchitooligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61: 975-978.
- Inui, H., Yamaguchi, Y., Ishigami, Y., Kawaguchi, S., Yamada, T., Ihara, H., Hirano, S. 1996. Three extracellular chitinases in suspension-cultured rice cells elicited by N-acetylchitooligosaccharides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60: 1956-1961.
- Iseli, B., Armand, S., Boller, T., Neuhaus, J.M., Henrissat, B. 1996a. Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. *FEBS Letters* 382: 186-188.
- Iseli, B., Boller, T., Neuhaus, J.M. 1993. The N-terminal cysteine-rich domain of tobacco class I chitinase is essential for chitin binding but not for catalytic or antifungal activity. *Plant Physiology* 103: 221-226.
- Iseli, B., Boller, T., Neuhaus, J.M. 1996b. Functional analysis of the domains of a plant PR-3 chitinase. En: *Chitin enzymology*. Muzarelli, R.A.A. (ed.), vol.2, Atec Edizioni, Italy. pp: 136-142.
- Ishikawa, H.A. 1996. Ultrastructural features of chilling injury: injured cells and the early events during chilling of suspension-cultured mung bean cells. *American journal of botany* 83: 825-835.
- Ismail, A.M., Hall, A.E., Close, T.J. 1999. Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. *Plant Physiology* 120: 237-244.
- IUPAC-IUB (1971) Nomenclature of multiple forms of enzymes. Recommendations. *Biochemistry* 10: 4825-4826.
- Ivanov, A.G., Hendrickson, L., Krol, M., Selstam, E., Oquist, G., Hurry, V., Huner, N.P.A. 2006. Digalactosyl-diacylglycerol deficiency impairs the capacity for photosynthetic intersystem electron transport and state transitions in *Arabidopsis thaliana* due to photosystem I acceptor-side limitations. *Plant and Cell Physiology* 47: 1146-1157.
- Iyo, A.H., Forsberg, C.W. 1999. A cold-active glucanase from the ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 995-998.
- Jach, G., Bornhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leah, R., Schell, J., Maas, C. 1995. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *The Plant Journal* 8: 97-109.
- Jackman R.L., Yada R.Y., Marangoni A., Parkin, K.L., Stanley, D.W. 1988. Chilling injury. A review of quality aspects. *Journal of Food Quality* 11: 253-278.
- Jagadeesh, B.H., Prabha, T.N., Srinivasan, K. 2004. Activities of glycosidases during fruit development and ripening of tomato (*Lycopersicon esculantum* L.): implication in fruit ripening. *Plant Science* 166: 1451-1459.
- Jagadeesh, B.H., Prabha, T.N. 2002. β -Hexosaminidase, a novel enzyme from ripening bell capsicum (*Capsicum annuum* var.) variata. *Phytochemistry* 61: 295-300.
- Jaglo, K.R., Kleff, S., Amundsen, K.L., Zhang, X., Haake, V., Zhang, J.Z., Deits, T., Thomashow, M.F. 2001. Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiology* 127: 910-917.
- Janas, K.M., Cvikrova, M., Palagiewicz, A., Szafranska, K., Posmyk, M.M. 2002. Constitutive elevated accumulation of phenylpropanoids in soybean roots at low temperature. *Plant Science* 163: 369-373.
- Janowiak, F., Maas, B., Dörffling, K. 2002. Importance of abscisic acid for chilling tolerance of maize seedlings. *Journal of Plant Physiology* 159: 635-643.
- Jay, G.D., Culp, D.J., Jahnke, M.R. 1990. Silver staining of extensively glycosylated proteins on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels: enhancement by carbohydrate-binding dyes. *Analytical Biochemistry* 185: 324-330.
- Je-Hyun, B., Beom-Ku, H., Do-Hyun, J. 2001. Distribution of chitinases in rice (*Oryza sativa* L.). Seed and characterization of a hull-specific chitinase. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 34: 310-315.
- Ji, C., Norton, R.A., Wicklow, D.T., Dowd, P.F. 2000. Isoform patterns of chitinase and β -1,3-glucanase in maturing corn kernels (*Zea mays* L.) associated with *Aspergillus flavus* milk stage induction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 507-511.
- Jin, Y., Jo, Y., Kim, K., Shim, J., Kim, Y., Park, R. 2002. Purification and characterization of beta-N-acetylhexosaminidase from rice seeds. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 35: 313-319.

- Johnson, F.H., Eyring, H., Sotver, B.J. 1974. *The theory of rate processes in biology and medicine*. Wiley, New York. pp. 703.
- Johnson, R., Ryan, C.A. 1990. Wound-inducible potato inhibitor II genes: Enhancement of expression by sucrose. *Plant Molecular Biology* 14: 527-536.
- Jonak, C., Okresz, L., Bogre, L., Hirt, H. 2002. Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 415-424.
- Jones, H.G., Jones, M.B. 1989. Introduction: some terminology and common mechanisms. En: *Plant under stress* Jones, H.G., Flowers, T.J., Jones, M.B. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge. pp: 1-10.
- Jones, J.D., Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature* 16: 323-329.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel DP, Bartel B. 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57: 19-53.
- Jongedijk, E., Tigelaar, H., van Roekel, J.S.C., Bres-Vloemans, S.A., Dekker, I, van denElzen, P.J.M., Cornelissen, B.J.C., and Melchers, L.S. 1995. Synergetic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica* 85: 173-180.
- Joosten, M.A.H.J., Verbakel, H.M., Nettekoven, M.E., van Leeuwen J., van der Vossen, R.T.M, de Wit, P.J.G. 1995. The phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* is not sensitive to the chitinase and β -1,3-glucanase defense proteins of its host, tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46: 45-59.
- Jorge, I., Navarro, R.M., Lenz, C., Ariza, D., Porras, C., Jorrín, J. 2005. The holm oak leaf proteome: analytical and biological variability in the protein expression level assessed by 2-DE and protein identification tandem mass spectrometry de novo sequencing and sequence similarity searching. *Proteomics* 5: 222 – 234.
- Jung, H.W., Kim, W., Hwang, B.K. 2003. Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. *Plant, Cell and Environment* 26: 915-928.
- Kader, A., Zagory, D., Kerbel, E.L. 1989. Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38: 1-30.
- Kader, A. 1986. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Technology* 40: 99-104.
- Kadyrzhanova, D.K., Vlachonassios, K.E., Ververidis, P., Dilley, D.R. 1998. Molecular cloning of a novel heat induced/chilling tolerance related cDNA in tomato fruit by use of mRNA differential display. *Plant Molecular Biology* 36: 885-895.
- Kamata, T., Uemura, M. 2004. Solute accumulation in heat seedlings during cold acclimation: Contribution to increased freezing tolerance. *Cryo Letters* 25: 311-322.
- Kamino, K. 2001. Novel barnacle underwater adhesive protein is a charged amino acid-rich protein constituted by a Cys-rich repetitive sequence. *Biochemical Journal* 356: 503-507.
- Kang, G.Z., Wang, Z.X., Xia, K.F., Sun, G.C. 2007. Protection of ultrastructure in chilling-stressed banana leaves by salicylic acid. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 8: 277-282.
- Kaniuga, Z. 2008. Chilling response of plants: importance of galactolipase, free fatty acids and free radicals. *Plant Biology* 10: 171-184.
- Kaplan, F., Guy, C. L. 2004. Beta-Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiology* 135: 1674-1684.
- Kasprzewska, A. 2003. Plant chitinases, regulation and function. *Cellular and Molecular Biology Letters* 8: 809-824.
- Kassanis, B., Gianinazzi, S, White, R.F. 1974. A possible explanation of the resistance of virus-infected tobacco to second infection. *Journal of General Virology* 23: 11-16.
- Kato, K., Yamada, A., Noguchi, M. 1973. Purification and some properties of β -1,3-glucanase of suspension-cultured tobacco cells. *Agricultural and Biological Chemistry* 37: 1269-1275.
- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P., Fritig, B. 1987. Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3-beta-glucanase activity. *The EMBO Journal* 6: 3209-3212.

- Kawada, K., Wheaton, T.A., Purvis, A.C., Grierson, W. 1979. Levels of growth regulators and reducing sugars of Marsh grapefruit peel as related to seasonal resistance to chilling injury. *HortScience* 14: 446.
- Kawamura, Y. 2008. Chilling induces a decrease in pyrophosphate-dependent H⁺-accumulation associated with a $\Delta\text{pH}_{\text{vac}}\text{-stat}$ in mung bean, a chill-sensitive plant. *Plant, Cell and Environment* 31: 288-300.
- Kawase, T., Yokokawa, S., Saito, A., Fujii, T., Nikaidou, N., Miyashita, K., Watanabe, T. 2006. Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinases from *S. coelicolor* A3(2). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 70: 988–998.
- Kazuoka, T., Oeda, K. 1994. Purification and characterization of COR85-oligomeric complex from cold-acclimated spinach. *Plant, Cell, and Physiology*. 35: 601-611
- Ke, D., Yahia, E., Mateos, M., Kader, A.A. 1994. Ethanol fermentation of “Bartlett” pears as influenced by ripening stage and atmospheric composition. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119: 976–982.
- Keefe, D., Hinz, U., Meins, F.J. 1990. The effect of ethylene on the cell-type-specific and intracellular localization of β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. *Planta* 182: 43-51.
- Kerdnaimongol, K., Woodson, W.R. 1999. Inhibition of catalase by antisense RNA increases susceptibility to oxidative stress and chilling injury in transgenic tomato plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124: 330–336.
- Kezuka, Y., Kitazaki, K., Itoh, Y., Watanabe, J., Takaha, O., Watanabe, T., Nishizawa, Y., Nonaka, T. 2004. Crystallization and preliminary X-ray analysis of plant class I chitinase from rice. *Protein Peptide Letters* 11: 401-405.
- Kikuchi, T., Masuda, K. 2009. Class II chitinase accumulated in the bark tissue involves with the cold hardiness of shoot stems in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Scientia Horticulturae* 120: 230-236.
- Kim, K.S., Kang, H.J., Hwang, I.K., Hwang, H.G., Kim, T.Y., Choi, H.C. 2004b. Comparative ultrastructure of ilpumbyeo, a high quality japonica rice, and its mutant, suweon 464: scanning and transmission electron microscopy studies. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 52: 3876-3883.
- Kim, T.E., Kim, S.K., Han, T.J., Lee, J.S., Chang, S.C. 2002. ABA and polyamines act independently in primary leaves of cold-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Physiologia Plantarum* 115: 370–376.
- Kim, T.H., Lee, B.R., Jung, W.J., Kim, K.Y., Avise, J.C., Ourry, A. 2004a. De novo protein synthesis in relation to ammonia and proline accumulation in water stressed white clover. *Functional Plant Biology* 31: 847–855
- Kim, Y.J., Hwang, B.K. 1997. Isolation of a basic 34 kiloDalton β -1,3-glucanase with inhibitory activity against *Phytophthora capsici* from pepper stems. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50: 103-115.
- Kim, M.G., Lee, K.O., Cheong, N.E., Choi, Y.O., Jeong, J.H., Cho, M.J., Kim, S.C., Lee, S.Y. 1999. Molecular cloning and characterization of a class III chitinase in pumpkin leaves, which strongly binds to regenerated chitin affinity gel. *Plant Science* 147: 157-163.
- King, A.I., Joyce, D.C., Reid, M.S. 1988. Role of carbohydrates in diurnal chilling sensitivity of tomato seedlings. *Plant Physiology* 86: 764-768.
- Király, L., Barna, B., Király, Z. 2007. Plant Resistance to Pathogen Infection: Forms and Mechanisms of Innate and Acquired Resistance. *Journal of Phytopathology* 155: 385-396.
- Kirsch, C., Hahlbrock, K., Kombrink, E. 1993. Purification and characterization of extracellular, acidic chitinase isoenzymes from elicitor-stimulated parsley cells. *European Journal of Biochemistry* 213: 419-425.
- Kishitani, S., Watanabe, K., Yasuda, S., Arakawa, K., Takabe, T., 1994. Accumulation of glycine betaine during cold acclimation and freezing tolerance in leaves of winter and spring barley plants. *Plant, Cell and Environment* 17: 89–95.
- Kitajima, S., Kamei, K., Taketani, S., Yamaguchi, M., Kawai, F., Komatsu, A., Inukai, Y. 2010. Two chitinase-like proteins abundantly accumulated in latex of mulberry show insecticidal activity. *BMC Biochemistry* 11: 6.
- Klesov, A. 1982. Mechanisms of production and consumption of intermediate cellooligosaccharides and cellobiose during enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose. *Biokhimiya* 42: 515-523.
- Klesov, A., Gngorash, S. Y. 1982. Kinetic mechanisms of hydrolisis of insoluble cellulose by multienzyme cellulase systems under nonsteady-state reaction conditions. *Biokhimiya* 42: 198-213.

- Knight, C.A., Hallett, J., De Vries, L.A. 1988. Solute effects on ice recrystallization: an assessment technique. *Cryobiology* 25: 55-60.
- Knight, H., Knight, M.R. 2001. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science*. 6: 262-267.
- Koag, M.C., Fenton, R.D., Wilkens, S., Close, T.J. 2003. The binding of maizeDHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. *Plant Physiology* 131: 309–316.
- Koga, D., Mitsutomi, M., Kono, M., Matsumiya, M. 1999. Biochemistry of chitinases. *Experientia* 87: 111-23.
- Koga, D., Tsukamoto, T., Sueshige, N. 1989. Kinetics of chitinase from yam, *Dioscorea opposita* Thunb. *Agricultural and Biological Chemistry* 53: 3121-3126.
- Koga, D., Yoshioka, T., Arakane, Y. 1998. HPLC analysis of anomeric formation and cleavage pattern by chitinolytic enzyme. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 62: 1643-1646.
- Koike, M., Okamoto, T., Tsuda, S., Imai, R. 2002. A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 298: 46–53.
- Komatsu, S., Yang, G., Khan, M., Onodera, H., Toki, S., Yamaguchi, M. 2007. Over-expression of calcium-dependent protein kinase 13 and calreticulin interacting protein 1 confers cold tolerance on rice plants. *Molecular Genetics and Genomics* 277: 713–723.
- Konrad, Z., Bar-Zvi, D. 2008. Synergism between the chaperone-like activity of the stress regulated ASR1 protein and the osmolyte glycine-betaine. *Planta* 227: 1213-1219.
- Koshland, J.D.E., Nemethy, G., Filmer, D. 1966. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 5:365–385.
- Koshland, D.E. 1970. *The Enzymes*. Vol 1, Academic Press, New York. pp: 341-396.
- Koster, K.L., Lynch, D.V., 1992. Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of Puma Rye. *Plant Physiology* 98: 108–113.
- Kozukue, N., Ogata, K. 1972. Physiological and chemical studies of chilling injury in pepper fruits. *Journal of Food Science* 37: 708-711.
- Kragh, K.M., Jacobsen, S., Mikkelsen, J.D., Nielsen, K.K. 1993. Tissue specificity and induction of class I, II and III chitinases in barley (*Hordeum vulgare*). *Physiologia Plantarum* 89: 490-498.
- Krall, J.P., Edwards, G.E. 1993. PEP carboxylases from two C4 species of Panicum with markedly different susceptibilities to cold inactivation. *Plant and Cell Physiology* 34: 1-11.
- Kramer, G.F., Wang, C.Y. 1989. Correlation of reduced chilling injury with increased spermine and spermidine levels in zucchini squash. *Physiologia Plantarum* 76: 479–484.
- Kramer, K.J., Muthukrishnan, S. 2005. Chitin metabolism in insects. En: *Comprehensive Molecular Insect Science*. Gilbert L.I., Latrou K., Gill S. (eds.), vol. 4, Biochemistry and Molecular Biology, Chapter 3, Elsevier Press, Oxford, UK. pp: 111-144.
- Kratsch, H.A., Wise, R.R. 2000. The ultrastructure of chilling stress. *Plant, Cell and Environment* 23: 337-350.
- Krebs, S.L., Grumet, R. 1993. Affinity purification and characterization of a β -1,3-endoglucanase from celery. *Plant Science* 93, 31-39.
- Krishnaveni S., Liang, G.H., Muthukrishnan, S., Manickam, A. 1999. Purification and partial characterization of chitinases from sorghum seeds. *Plant Science* 144: 1-7.
- Kuchitsu K., Kosaka H., Shiga T., Shibuya, N. 1995. EPR evidence for generation of hydroxyl radical triggered by N-acetylchitoooligosaccharide elicitor and a protein phosphatase inhibitor in suspension cultures rice cells. *Protoplasma* 188: 138-142.
- Kumar, S.V., Wigge, P.A. 2010. H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell* 140: 136-147.
- Kumar, P.K., Singh, R.A. 1991. Germination and metabolism in susceptible and tolerant mung bean genotypes under moisture stress. *Indian Journal of Plant Physiology* 34: 267-270.

- Kunz, C., Sellam, O., Bertheau, Y. 1992. Purification and characterisation of a chitinase from the hyperparasitic fungus *Aphanocladium album*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 40: 117-131.
- Kuo, C.J., Liao, Y.C., Yang, J.H., Huang, L.C., Chang, C.T., Sung, H.Y. 2008. Cloning and characterization of an antifungal class III chitinase from suspension-cultured bamboo (*Bambusa oldhamii*) cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 11507-11514.
- Kuranda, M.J., Robbins P.W. 1991. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 19707-19758.
- Kurosaki, F., Tashiro, N., Gamou, R., Nishi, A. 1989. Chitinase isoenzymes induced in carrot cell culture by treatment with ethylene. *Phytochemistry* 28: 2989-2992.
- Kurosaki, F., Tashiro, N., Nishi, A. 1988. Role of Chitinase and Chitin Oligosaccharides in Lignification Response of Cultured Carrot Cells Treated with Mycelial Walls. *Plant and Cell Physiology* 29: 527-531.
- Kuwabara, C., Takezawa, D., Shimada, T., Hamada, T., Fujikawa, S., Arakawa, K. 2002. Absciscic acid- and cold-induced thaumatin-like protein in winter wheat has an antifungal activity against snow mould, *Microdochium nivale*. *Physiologia Plantarum* 115: 101-110.
- Kwon, Y., Kim, S.H. 2007. *Arabidopsis* *bot2* encodes an endochitinase-like protein that is essential for tolerance to heat, salt and drought stresses. *The Plant Journal* 49: 184-193.
- Lacan, D., Baccou, J.C. 1996. Changes in lipids and electrolyte leakage during nonnetted muskmelon ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121: 554-558.
- Lacan, D., Baccou, J.C. 1998. High levels of antioxidant enzymes correlate with delayed senescence in non netted muskmelon fruits. *Planta* 204: 377-382.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lafuente, M.T., Martínez-Téllez, M.A., Zacarias, L. 1997. Absciscic acid in the response of Fortune mandarin to chilling. Effects of maturity and high-temperature conditioning. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73: 494-502.
- Lafuente, M.T., Sala, J.M., Zacarias, L. 2004. Active oxygen detoxifying enzymes and phenylalanine ammonia-lyase in the ethylene-induced chilling tolerance in citrus fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 3606-3611.
- Lafuente, M.T., Zacarias, L., Martínez-Téllez, M.A., Sanchez-Ballesta, M.T., Dupille, E. 2001. Phenylalanine ammonia-lyase as related to ethylene in the development of chilling symptoms during cold storage of citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 6020-6025.
- Lafuente, M.T., Zacarias, L., Martinez-Téllez, M.A., Sanchez-Ballesta, M.T., Granell, A., 2003. Phenylalanine ammonia-lyase and ethylene in relation to chilling injury as affected by fruit age in citrus. *Postharvest Biology and Technology* 29: 308-317.
- Lageix, S., Lanet, E., Pouch-Pélissier, M.N., Espagnol, M.C., Robaglia, C., Deragon, J.M., Pélissier, T. 2008. *Arabidopsis* eIF2alpha kinase GCN2 is essential for growth in stress conditions and is activated by wounding. *BMC Plant Biology* 24: 134.
- Lagrimini, L.M., Burkhart, W., Moyer, M. Rothstein, S. 1987. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 7542-7546.
- Lahoz, E., Contillo, R., Porrone, F. 2004. Induction of systemic resistance to *Erysiphe orontii* cast by application on roots of an isolate of *Gliocladium roseum* Bainier. *Journal of Phytopathology* 152: 465-470.
- Lahoz, J., Gutiérrez, M., Sola, M.M., Salto, R., Pascual, L., Martínez-Cayuela, M., Vargas, A.M. 1993. Ethylene in cherimoya fruit (*Annona cherimola* Mill.) under different storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 721-723.
- Laing, W., Christeller, J. 2004. Extraction of proteins from plant tissues. En: *Current Protocols in Protein Science*. 38: 4.7.1-4.7.7.
- Lam, S.K., Ng, T.G. 2001. Isolation of a small chitinase-like antifungal protein from *Panax notoginseng* (sanchi ginseng) roots. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 33: 287-292.

- Langsford, M.L., Gilkes, N.R., Singh, B., Moser, B., Miller, R.C., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G. 1987. Glycosylation of bacterial cellulases prevents proteolytic cleavage between functional domains. *FEBS Letters* 225: 163-167.
- Lapous, D., Mathieu, Y., Guern, J., Lauriere, C. 1998. Increase of defense gene transcripts by cytoplasmic acidification in tobacco cell suspension cultures. *Planta* 205: 452–458.
- Lawrence, C.B., Joosten, M.H.A.J., Tuzun, S. 1996. Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 48: 361–377.
- Lawrence, C.B., Singh, N.P., Qui, J., Gardner, R.G., Tuzun, S. 2000. Constitutive hydrolytic enzymes are associated with polygenic resistance of tomato to *Alternaria solani* and may function as an elicitor release mechanism. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 211-220.
- Lawrence, S.D., Novak, N.G. 2006. Expression of poplar chitinase in tomato leads to inhibition of development in Colorado potato beetle. *Biotechnology Letters* 28: 593–599.
- Lawton, K.A., Potter, S.L., Uknes, S., Ryals, J. 1994a. Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *The Plant Cell* 6: 581-588.
- Lawton, K.A., Ward, E., Payne, G., Moyer, M., Ryals, J. 1992. Acidic and basic class III chitinase mRNA accumulation in response to TMV infection of tobacco. *Plant Molecular Biology* 19: 735-743.
- Lawton, K.A., Beck, J., Potter, S., Ward, E., Ryals, J. 1994b. Regulation of cucumber class III chitinase gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7: 48-57.
- Lee, B.H., Won, S.H., Lee, H.S., Miyao, M., Chung, W.I., Kim, I.J., Jo, J. 2000. Expression of the chloroplast-localized small heat shock proteins by oxidative stress in rice. *Gene* 245: 283–290.
- Lee, B.H., Henderson, D.A., Zhu, J.K. 2005. The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *The Plant Cell* 17: 3155–3175.
- Lee, B.R., Jung, W.J., Lee, B.H., Avice, J.C., Ourry, A., Kim, T.H. 2008. Kinetics of drought-induced pathogenesis-related proteins and its physiological significance in white clover leaves. *Physiologia Plantarum* 132: 329–337.
- Lee, B.H., Lee, H., Xiong, L., Zhu, J.K. 2002. A mitochondrial complex I defect impairs cold regulated nuclear gene expression. *The Plant Cell* 14: 1235–1251.
- Legaz, M.E., Armas, R., Pinon, D., Vicente, C. 1998. Relationships between phenolics-conjugated polyamines and sensitivity of sugarcane to smut (*Ustilago scitaminea*). *Journal of Experimental Botany* 49: 1723-1728.
- Légrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Fritig, B. 1987. Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 6750-6754.
- Lehrer, G.M., Barker, R. 1970. Conformational changes in rabbit muscle aldolase. Kinetic studies. *Biochemistry* 9: 1533-1540.
- Leiros, H.K., Pey, A.L., Innes, M., Moe, E., Leiros, I., Steen, I.H., Martinez, A. 2007. Structure of phenylalanine hydroxylase from *Colwellia psychrerythraea* 34H, a monomeric cold active enzyme with local flexibility around the active site and high overall stability. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 21973-21986.
- Lerner, D.R., Raikhel, N.V. 1992. The gene for stinging nettle lectin (*Urtica dioica* agglutinin) encodes both a lectin and a chitinase. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 11085-11091.
- Leubner-Metzger, G., Meins, F.J. 1999. Functions and Regulation of Plant β -1,3-Glucanases (PR-2). En: *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. Datta, S.K., Muthukrishnan, S. (eds.), CRC Press LLC, Boca Raton, USA. pp: 49-76.
- Leubner-Metzger, G., Frundt, C., Vogeli-Lange, R., Meins, F.J. 1995. Class I β -1,3-glucanases in the endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiology* 109: 751-759.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. 1994. H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *The Cell* 79: 583–593.
- Lewis, N.G., Yamamoto, E. 1990. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 455–496.

- Li, C., Shena, W., Lua, W., Jiang, Y., Xiec, J., Chena, J. 2009. 1-MCP delayed softening and affected expression of XET and EXP genes in harvested cherimoya fruit. *Postharvest Biology and Technology* 52: 254–259.
- Li, N., Andorfer, C.A., Duman, J.G. 1998. Enhancement of insect antifreeze protein activity by solutes of low molecular mass. *The Journal of Experimental Biology* 201: 2243–2251.
- Li, S.C., Li, Y.T. 1970. Studies of the glycosidases of jack bean meal. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 1564–1573.
- Li, W.L., Faris, J.D., Muthukrishnan, S., Liu, D.J., Chen, P.D., Gill, B.S. 2001. Isolation and characterization of novel cDNA clones of acidic chitinases and β -1,3-glucanases from wheat spikes infected by *Fusarium graminearum*. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 353–362.
- Li, Y.C., Chang, C.T., Hsiao, E.S., Hsu, J.S., Huang, J.W., Tzen, J.T.C. 2003. Purification and characterization of an antifungal chitinase in jelly fig (*Ficus avicciens*) achenes. *Plant and Cell Physiology* 44: 1162–1167.
- Li, Y.C., Yang, C.Y., Hsu, J.S.F., Wu, D.J., Wu, H.H., Tzen, J.T.C. 2005. Cloning and immunolocalization of an antifungal chitinase in jelly fig (*Ficus avicciens*) achenes. *Phytochemistry* 66: 879–886.
- Liao, Y.C., Kreuzaler, F., Fischer, R., Reisener, H.J., Tiburzy, R. 1994. Characterization of a wheat class Ib chitinase gene differentially induced in isogenic lines by infection with *Puccinia graminis*. *Plant Science* 103: 177–187.
- Lichtenthaler, H.K. 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology* 148: 4–14.
- Lill, R.E. 1985. Alleviation of internal breakdown of nectarines during cold storage by intermittent warming. *Scientia Horticulturae* 25: 241–246.
- Lin, C., Thomashow, M.F. 1992. A cold-regulated *Arabidopsis* gene encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 183: 1103–1108.
- Lin, W., Anuratha, C.S., Datta, K., Potrykus, I., Muthukrishnan, S., Datta, S.K. 1995. Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Biotechnology* 13: 686–691.
- Lin, Z.F., Wu, D., Luo, A., Zhang, W. 1992. Chitinase from seed of *Zea mays* and *Coix lacrymjobi* L., purification and some properties. *Process Biochemistry* 27: 83–88.
- Lingle, S.E., Dunlap, J.R. 1987. Sucrose metabolism in netted muskmelon fruit during development. *Plant Physiology* 84: 386–389.
- Linthorst, H.J., Danhash, N., Brederode, F.T., van Kan, J.A., de Wit, P.J., Bol, J.F. 1991. Tobacco and tomato PR proteins homologous to win and pro-hevein lack the "hevein" domain. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4: 586–592.
- Linthorst, H.J.M., Melchers, L.S., Mayer, A., van Roekel, J.S.C., Cornelissen, B.J.C., Bol, J.F. 1990. Analysis of gene families encoding acidic and basic β -1,3-glucanases of tobacco. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 8756–8760.
- Lipton, W.J., Wang, C.Y. 1987. Chilling exposures and ethylene treatment change the level of ACC in 'Honey Dew' melons. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 112: 109–112.
- Liska, A.J., Shevchenko, A., Pick, U., Katz, A. 2004. Enhanced Photosynthesis and Redox Energy Production Contribute to Salinity Tolerance in *Dunaliella* as Revealed by Homology-Based Proteomics. *Plant Physiology* 136: 2806–2817.
- Liu, B., Lu, Y., Xin, Z., Zhang, Z. 2009. Identification and antifungal assay of a wheat β -1,3-glucanase. *Biotechnology Letters* 31: 1005–1010.
- Liu, H.L., Dai, X.Y., Xu, Y.Y., Chong, K. 2007. Over-expression of OsUGE-1 altered raffinose level and tolerance to abiotic stress but not morphology in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology* 164: 1384–1390.
- Liu, J.J., Ekramoddoullah, A.K., Zamani, A. 2005. A class IV chitinase is up-regulated by fungal infection and abiotic stresses and associated with slow-canker-growth resistance to *cratium ribicola* in western white Pine (*Pinus monticola*). *Phytopathology* 95: 284–291.
- Livne, B., Faktor, O., Zeitoune, S., Edelbaum, O., Sela, I. 1997. TMV-induced expression of tobacco β -glucanase promoter activity is mediated by a single, inverted, GCC motif. *Plant Science* 130: 159–169.
- Lloyd, A.W., Ollif, C.J., Rutt, K.J. 1994. A study of modified betaines as cryoprotective additives. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 46: 704–707.

- Long, S.P. 1983. C4 photosynthesis at low temperatures. *Plant, Cell and Environment* 6: 345-363.
- Lonhienne, T., Baise, E., Feller, G., Bouriotis, V., Gerday, C. 2001a. Enzyme activity determination on macromolecular substrates by isothermal titration calorimetry: application to mesophilic and psychrophilic chitinases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1545: 349-356.
- Lonhienne, T., Gerday, C., Feller, G. 2000. Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility. *Biochimica et Biophysica Acta* 1543: 1-10.
- Lonhienne, T., Zoidakis, J., Vorgias, C.E., Feller, G., Gerday, C., Bouriotis, V. 2001b. Modular Structure, Local Flexibility and Cold-activity of a Novel Chitinase from a Psychrophilic Antarctic Bacterium. *Journal of Molecular Biology* 310: 291-297.
- López-Matas, M.A., Nuñez, P., Soto, A., Allona, I., Casado, R., Collada, C., Guevara, M.A., Aragoncillo, C., Gomez L. 2004. Protein cryoprotective activity of a cytosolic small heat shock protein that accumulates constitutively in chestnut stems and is up-regulated by low and high temperatures. *Plant Physiology* 134: 1708-1717.
- Lorenzo, O., Solano, R. 2005 Molecular players regulating the jasmonate signaling network. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 532-540.
- Lorito, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Broadway, R.M., Tronsmo, A., Woo, S.L., Di Pietro, A. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*. Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302-307.
- Lorito, M., Woo, S.L., Donzelli, B., Scala, F. 1996. Synergistic, antifungal interactions of chitinolytic enzymes from fungi, bacteria and plants. En: *Chitin enzymology*, Muzzarelli, R.A.A. (eds.), vol 2, Atec edizioni, Italy. pp: 157-164.
- Lotan, T., Ori, N., Fluhr, R. 1989. Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. *The Plant Cell* 1: 881-887.
- Low, P.S., Bada, J.L., Somero, G.N. 1973. Temperature adaptation of enzymes: roles of the free energy, the enthalpy, and the entropy of activation. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 430-432.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, N.J., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Lu, M., Wang, B., Li, Z., Fei, Y., Wei, L., Gao, S. 2002. Differential scanning calorimetric and circular dichroistic studies on plant antifreeze proteins. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 67: 689-698.
- Ludwig, A., Boller, T. 1990. A method for the study of fungal growth inhibition by plant proteins. *FEMS Microbiology Letters* 69: 61-66.
- Lurie, S., Klein, J.D. 1991. Acquisition of low-temperature tolerance in tomatoes by exposure to high-temperature stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116: 1007-1012.
- Lurie, S., Pesis, E. 1992. Effect of acetaldehyde and anaerobiosis as postharvest treatments on the quality of peaches and nectarines. *Postharvest Biology and Technology* 1: 317-326.
- Lurie, S. 1998. Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology* 14: 257-269.
- Lurie, S., Sabehat, A. 1997. Prestorage temperature manipulations to reduce chilling injury in tomatoes. *Postharvest Biology and Technology* 11: 57-62.
- Lurie, S. 2009. Stress Physiology and Latent Damage. En: *Postharvest handling: a systems approach*. Florkowski, W., Prussia, S., Shewfelt, R., Brueckner, B. (eds.), Academic Press, New York. pp: 443-459.
- Lyons, J.M. 1973. Chilling Injury in Plants. *Annual Review of Plant Physiology* 24: 445-466.
- Mackey, A.J., Haystead, T.A.J., Pearson, W.R. 2002. Getting more from less: algorithms for rapid protein identification with multiple short peptide sequences. *Molecular Cell Proteomics* 1: 139 - 147.
- Malacrida, C., Valle, E.M., Boggio, S.B. 2006. Postharvest chilling induces oxidative stress response in the dwarf tomato cultivar Micro-Tom. *Physiologia Plantarum* 127: 10-18.
- Maldonado, R., Escribano, M.I., Merodio, C. 2002a. Relationship between the levels of ammonia and coordination of phenylalanine ammonia-lyase and phosphoenolpyruvate carboxylase in *Annona cherimola* stored under different conditions. *Postharvest Biology and Technology* 25: 301-309.

- Maldonado, R., Molina-García, A.D., Sánchez-Ballesta, M.T., Escribano, M.I., Merodio, C. 2002b. High CO₂ atmosphere modulating the phenolic response associated with cell adhesion and hardening of *Annona cherimola* fruit stored at chilling temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7564-7569.
- Maldonado, R., Sánchez-Ballesta, M.T., Alique, R., Escribano, M.I., Merodio, C. 2004. Malate metabolism and adaptation to chilling temperature storage by pretreatment with high CO₂ levels in *Annona cherimola* fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4758-4763.
- Manocha, M.S., Balasubramian, R. 1994. Fungal chitinases: their properties and roles in morphogenesis, mycoparasitism and control of pathogenic fungi. En: *Host Wall Alterations by Parasitic Fungi*. Petrini, O., Ouellette, G.B. (eds), APS Press, St. Paul. pp: 81-90.
- Mansfield, J. W. 1980. Mechanism of resistance to *Botrytis cinerea*. En: *The biology of Botrytis cinerea*. Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K., Jarvis, W. R. (eds.), Academic Press, New York. pp: 181-218.
- Mäntylä, E., Lang, V., Palva, E.T. 1995. The role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation, and accumulation of LTI18 and RAB18 proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 107: 141-148.
- Mao, L., Pang, H., Wang, G., Zhu, C. 2007. Phospholipase D and lipoxygenase activity of cucumber fruit in response to chilling stress. *Postharvest Biology and Technology* 44: 42-47.
- Marangoni, A.G., Palma, T., Stanley, D.W., 1996. Membrane effects in postharvest physiology. *Postharvest Biology and Technology* 7: 193-217.
- Marangoni, A.G., Stanley, D.W. 1989. Phase transitions in microsomal membranes from chilling sensitive and chilling resistant tomato plants and fruit. *Phytochemistry* 28: 2293-2301.
- Marín, J. 1997. La atmosfera controlada y el encerrado en conservación de frutos de chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.) cv. Bronceada. Tesis Doctoral. Universidad de Chile, Chile. pp. 60
- Markhart, A.H. 1986. Chilling injury: a review of possible causes. *HortScience*, 21:1329-1333 (1986).
- Martínez-Téllez, M.A., Lafuente, M.T. 1997. Effects of high temperature conditioning in ethylene, phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase activities in flavedo of 'Fortune' mandarin fruit. *Journal of Plant Physiology* 150: 674-678.
- Martinón, F., Tschopp, J. 2005. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends in Immunology* 26: 447 – 454.
- Masuda, S., Kamada, H., Satoh, S. 2001. Chitinase in cucumber xylem sap. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65: 1883-1885.
- Mattoo, A.K., Handa, A.K. 2004. Ethylene signalling in plant cell death. En: *Plant Cell Death Processes*. Nooden, L. (ed.), Academic Press, London. pp: 125-142.
- Mauch, F., Hadwiger, L.A., Boller, T. 1988a. Antifungal hydrolases in pea tissues. I. Purification and characterization of two chitinases and two β -1,3-glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection. *Plant Physiology* 87: 325-333.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B., Boller, T. 1988b Antifungal hydrolases in pea tissues. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinases and β -1,3-glucanase. *Plant Physiology* 88: 936-942.
- Mauch, F., Staehelin, A.L. 1989. Functional implications of the subcellular localization of ethylene induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. *The Plant Cell* 1: 447-457.
- Mauch-Mani, B., Mauch, F. 2005. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 409-414.
- Mavromatis, K., Lorito, M., Woo, S.L., Bouriotis, V. 2003. Mode of action and antifungal properties of two cold-adapted chitinases. *Extremophiles* 7: 385-390.
- Mayer, C., Rast, D.M. 1997. High-pH anion-exchange chromatography analysis of hydrolysis and transglycosylation catalyzed by chitinolytic enzymes. En: *Chitin Handbook*. Muzzarelli, R.A.A., Peters, M.G. (eds.), European Chitin Society, Ancona. pp: 345-352.
- Mayer, C., Ruffner, H.P., Rast, D.M. 1996b. Assessment of the mode of action of chitinases with anion exchange chromatography/pulsed amperometric detection. En: *Advances in Chitin Science*. Domard, A., Jeuniaux, C., Muzzarelli, R.A.A., Roberts, G. (eds.), vol. 1, Jacques Andre Publishers, Lyon. pp : 108-113.

- Mayer, R.T., McCollum, T.G., Niedz, R.P., Hearn, C.J., McDonald, R.E., Berdis, E., Doostdar, H. 1996a. Characterization of seven basic endochitinases isolated from cell cultures of *Citrus sinensis* (L.). *Planta* 200: 289-295.
- McCollum, T.G., Doostdar, H., Mayer, R.T., McDonald, R.E. 1997. Characterization of chitinases and β -1,3-glucanases in grapefruit flavedo during fruit development. *Physiologia Plantarum* 99: 486-494.
- McCollum, T.G., Doostdar, H., Niedz, R.P., Mayer, R.T., Burkhardt, M., McDonald, R.E. 1999. Biochemical, molecular genetic, and immunological characterization of a β -1,3-endoglucanase from 'Valencia' Orange callus. *Journal of Plant Physiology* 155: 16-23.
- McCue, K.F., Hanson, A.D. 1990. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends in Biotechnology* 8: 358-362.
- McDonald, R.E., Kushad, M.M. 1986. Accumulation of putrescine during chilling injury of fruits. *Plant Physiology* 82: 324-326.
- McKown, R., Kuroki, G., Warren, G. 1996. Cold responses of *Arabidopsis* mutants impaired in freezing tolerance. *Journal of Experimental Botany* 47: 1919-1925.
- McNaught, A.D., Wilkinson, A. 1997. *Compendium of Chemical Terminology*. 2nd ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 464.
- Meikle, P.J., Bonig, I., Hoogenraad, N.J., Clarke, A.E., Stone, B.A. 1991. The location of (1 \rightarrow 3)- β -glucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana glauca* using a (1 \rightarrow 3)- β -glucan-specific monoclonal antibody. *Planta* 185: 1-8.
- Meins, F.J., Neuhaus J.M., Sperisen C., Ryals, J. 1992. The primary structure of plant pathogenesis-related glucanohydrolases and their genes. En: *Genes Involved in Plant Defense*. Boller, T., Meins F. J. (eds.), Springer-Verlag, Vienna, New York. pp: 245-282.
- Meir, S., Akerman, M., Fuchs, Y., Zauberman, G. 1995. Further studies on the controlled atmosphere storage of avocados. *Postharvest Biology and Technology* 5: 323-330.
- Meir, S., Naiman, D., Akerman, M., Hyman, J.Y., Zauberman, G., Fuchs, Y. 1997. Prolonged storage of 'Hass' avocado fruit using modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology* 12: 51-60.
- Meir, S., Philosoph-Hadas, S., Lurie, S., Droby, S., Akerman, M., Zauberman, G., Shapiro, B., Cohen, E., Fuchs, Y. 1996. Reduction of chilling injury in stored avocado, grapefruit, and bell pepper by methyl jasmonate. *Canadian Journal of Botany* 74: 870-874.
- Melchers, L.S., Apotheker-de Groot, M., Van der Knaap, J.A., Ponstein, A.S., Sela-Buurlage, M.B., Bol, J.F., Cornelissen, B.J.C., Van den Elzen, P.J.M. Linthorst, H.J.M. 1994. A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *The Plant Journal* 5: 469-480.
- Melchers, L.S., Sela-Buurlage, M.B., Vloemans, S.A., Woloshuk, C.P., Vanroekel, J.S.C., Pen, J., van den Elzen, P.J.M., Cornelissen, B.J.C. 1993. Extracellular targeting of the vacuolar tobacco proteins-AP24, chitinase and β -1,3-glucanase in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 21: 583-593.
- Memelink, J., Linthorst, H.J., Schilperoort, R.A., Hoge, J.H.C. 1990. Tobacco genes encoding acidic and basic isoforms of pathogenesis-related proteins display different expression patterns. *Plant Molecular Biology* 14: 119-126.
- Merodio, C., De La Plaza, J.L. 1997. Cherimoya. En: *Postharvest physiology and storage of tropical and subtropical fruits*. Mitra S.K. (ed.), Wallingford: CAB International. pp: 265-290.
- Merodio, C., Muñoz, M.T., Del Cura, B., Buitrago, D., Escibano, M.I. 1998. Effect of high CO₂ level of the titres of γ -aminobutyric acid, total polyamines and some pathogenesis-related proteins in cherimoya fruit stored at low temperature. *Journal of Experimental Botany* 49: 1339-1347.
- Merzendorfer, H., Zimoch, L. 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology* 206: 4393-4412.
- Métraux, J.P., Boller, T. 1986. Local and systemic induction of chitinase in cucumber plants in response to viral, bacterial and fungal infections. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 28: 161-169.
- Métraux, J.P., Streit, L., Staub, T. 1988. A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 33: 1-9.

- Michaux, C., Massant, J., Kerff, F., Frère, J.M., Docquier, J.D., Vandenberghe, I., Samyn, B., Pierrard, A., Feller, G., Charlier, P., Van Beeumen, J., Wouters, J. 2008. Crystal structure of a cold-adapted class C β -lactamase. *FEBS Journal* 275: 1687-1697.
- Mikkelsen, J.D., Berglund, L., Nielsen, K.K., Christiansen, H., Bojsen, K. 1992. Structure of endochitinase genes from sugar beets. *Advances in chitin and chitosan*. Brine CJ, Sandford P.A., Zikakis J.P. (eds). pp: 344-353. Elsevier, New York, USA.
- Miller, G., Shulaev, V., Mittler, R. 2008. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum* 133: 481-489.
- Miranda, J.A., Avonce, N., Suárez, R., Thevelein, J.M., Van Dijck, P. and Iturriaga, G. 2007. A bifunctional TPS-TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 226: 1411-1421.
- Mitchum, E.J., McDonald, R.E. 1992. Effect of high temperature on cell wall modifications associated with tomato fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology* 3: 257-264.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Mittler, R., Kim, Y., Song, L., Coutu, J., Coutu, A., Ciftci-Yilmaz, S., Lee, H., Stevenson, B., Zhu, J.K. 2006. Gain- and loss-of-function mutations in *Zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress. *FEBS Letters* 580: 6537-6542.
- Molano, J., Durán, A., Cabib, E. 1977. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Analytical Biochemistry* 83: 648-656.
- Molina, A., García-Olmedo, F. 1993. Developmental and pathogen induced expression of three barley genes encoding lipid transfer proteins. *The Plant Journal* 4: 983-991.
- Momma, M., Kaneko, S., Haraguchi, K., Matsukura, U. 2003. Peptide mapping and assessment of cryoprotective activity of 26/27 kDa dehydrin from soybean seeds. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 67: 1832-1835.
- Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.P. 1965. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *Journal of Molecular Biology* 12: 88-118.
- Montero, L.M., Escribano M.I., De La Plaza, J.L., Merodio, C. 1995. Chilling temperature storage induces changes in protein patterns and protease activity in cherimoya fruit. *Postharvest Biology and Technology* 5: 251-260.
- Monzingo, A.F., Marcotte, E.M., Robertus, J.D. 1996. Chitinases, chitosanases, and lysozymes can be divided into procaryotic and eucaryotic families sharing a conserved core. *Nature Structural Biology* 3: 133-140.
- Moore, K.G., Price, M.S., Boston, R.S., Weissinger, A.K., Payne, G.A. 2004. A chitinase from *Tex6* maize kernels inhibits growth of *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 94: 82-87.
- Morales, M.A., Cooper C.T. 1977. Identificación de hongos causantes de pudriciones en chirimoyas (*Annona cherimola* Mill.) almacenadas a baja temperatura. *Investigación Agrícola* 3: 75-76.
- Morohashi, Y., Matsushima, H. 2000. Development of β -1,3-glucanase activity in germinated tomato seeds. *Journal of Experimental Botany* 51: 1381-1387.
- Moustafa, S.A., Ismail, I.M., Metry, E.A., Ghazal, S., Ibrahim, M.A. 2007. Cloning and characterization of β -1, 3 glucanase from blight resistant and susceptible potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. *Journal of Applied Sciences Research* 3: 1960-1968.
- Mulas, M., Schirra, M. 2007. The effect of heat conditioning treatments on the postharvest quality of horticultural crops. *Stewart Postharvest Review* 3: 1-6.
- Mulas, M., Lafuente, M. T., Zacarias, L. 1996. Chilling effects on fatty acid composition of flavedo lipids in stored Fortune mandarins. *Advances in Horticultural Science* 10: 85-90.
- Mulas, M., Lafuente, M.T., Zacarias, L. 1997. Postharvest temperature conditioning and chilling effects on flavedo lipid composition of 'Fortune' mandarin. *Proceedings of the International Society of Citriculture* 2: 1132-1135.
- Münch-Garhoff, S., Neuhaus, J.M., Boller, T., Kemmerling, B., Kogel, K.H. 1997. Expression of β -1,3-glucanase and chitinase in healthy, stem-rust-affected and elicitor-treated near-isogenic wheat lines showing *Sr5*-or *Sr24*-specified race-specific rust resistance. *Planta* 201: 235-244.

- Muñoz, M.T. 2000. Respuestas metabólicas de cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) bajo condiciones programadas de CO₂ y temperatura y su monitorización por resonancia magnética nuclear. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, España. pp. 207.
- Muñoz, M.T., Aguado, P., Ortega, N., Escribano, M.I., Merodio, C., 1999. Regulation of ethylene and polyamine synthesis by elevated carbon dioxide in cherimoya fruit stored at ripening and chilling temperatures. *Australian Journal of Plant Physiology* 26: 201-209.
- Muñoz, M.T., Escribano, M.I., Merodio, C. 1997. Ethanolic metabolism in cherimoya fruit during storage at ambient and under high CO₂ atmosphere. *Journal of Horticultural Science* 72: 363-370.
- Muñoz, M.T., Escribano, M.I., Merodio, C. 2001. Phosphoenolpyruvate carboxylase from cherimoya fruit: properties, kinetics and effects of high CO₂. *Phytochemistry* 58: 1007-1013.
- Mur, L.A., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., Prats, E. 2008. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?. *Journal of Experimental Botany* 59: 501-520.
- Murashima, K., Kosugi, A., Doi, R.H. 2003. Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from *Clostridium cellulovorans* on plant cell wall degradation. *Journal of Bacteriology* 185: 1518-1524.
- Murata, N., Los, D. 1997. Membrane fluidity and temperature perception. *Plant Physiology* 115: 875-879.
- Nagao, M., Minami, A., Arakawa, K., Fujikawa, S., Takezawa, D. 2005. Rapid degradation of starch in chloroplasts and concomitant accumulation of soluble sugars associated with ABA-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of plant physiology* 162: 169-180.
- Naidu, B.P., Paleg, L.G., Aspinall, D., Jennings, A.C., Jones, G.P., 1991. Amino acid and glycine betaine accumulation on cold-stressed wheat seedlings. *Phytochemistry* 30: 407-409.
- Nair, S., Singh, Z. 2004. Chilling injury in mango fruit in relation to biosynthesis of free polyamines. *Journal of horticultural science and biotechnology* 79: 515-522.
- Nakagami, H., Pitzschke, A., Hirt, H. 2005. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling. *Trends in Plant Science* 10: 339-346.
- Nakamura, T., Ishikawa, M., Nakatani, H., Oda, A. 2008. Characterization of cold-responsive extracellular chitinase in Bromegrass cell cultures and its relationship to antifreeze activity. *Plant Physiology* 147: 391-401.
- Nakano, R., Ishida, H., Makino, A., Mae, T. 2006. *In vivo* fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species in an intact leaf of cucumber under chilling-light conditions. *Plant and Cell Physiology* 47: 270-276.
- Nari, J., Mouttet, C., Fouchier, F., Ricard, J. 1974. Subunit interactions in enzyme catalysis: kinetic models for one-substrate polymeric enzymes. *European Journal of Biochemistry* 41: 499-515.
- Narváez-Trujillo, A., Barreiro, J.M., Morales Astudillo, R. 2007. Tracing the genetic base of cherimoya (*Annona cherimola*) commercial cultivars through AFLP analysis of diversity at the species putative center of origin. *Acta Horticulturae* 738: 459-465.
- Nayyar, H., Chander, S. 2004. Protective effects of polyamines against oxidative stress induced by water and cold stress in chickpea. *Journal of Agronomy and Crop Science* 190: 355-365.
- Neale, A.D., Wahleithner, J.A., Lund, M., Bonnett, H.T., Kelly, A., Meeks Wagne, D.R., Peacock, W.J., Dennis, E.S. 1990. Chitinase, β -1,3-glucanase, osmotin and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. *The Plant Cell* 2: 673-684.
- Nebreda, A.R., Villa, T.G., Villanueva, J.R., del Rey, F. 1986. Cloning of genes related to exoglucanase production in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of an exo- β -glucanase structural gene. *Gene* 47: 245-259.
- Neet, K.E., Ainslie, R.E. 1980. Hysteretic enzymes. *Methods in enzymology* 64: 192-226.
- Negri, A.S., Prinsi, B., Rossoni, M., Failla, O., Scienza, A., Cocucci, M., Espen, L. 2008. Proteome changes in the skin of the grape cultivar Barbera among different stages of ripening. *BMC Genomics* 9: 378.
- Nema, S., Avis, K.E. 1993. Freeze-thaw studies of a model protein, lactate dehydrogenase, in the presence of cryoprotectants. *Journal of parenteral science and technology* 47: 76-83.

- Neta-Sharir, I., Isaacson, T., Lurie, S., Weiss, D. 2005. Dual role for tomato heat shock protein 21: protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. *The Plant Cell* 17: 1829–1838.
- Neuhaus, J.M. 1999. Functions and regulation of plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). En: *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. Datta, S.K., Muthukrishnan, S. (eds.), CRC Press LLC, Boca Raton, USA. pp: 77-105.
- Neuhaus, J.M., Fritig, B., Linthorst, H.J.M., Meins, F.J., Mikkelsen, J. D., Ryals, J. 1996. A revised nomenclature for chitinase genes. *Plant Molecular Biology Reporter* 14: 102-104.
- Neuhaus, J.M., Sticher, L., Meins, F.J., Boller, T. 1991. A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 10362-10366.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255-262.
- Newton, S.S., Duman, J.G. 2000. An osmotin-like cryoprotective protein from the bittersweet nightshade *Solanum dulcamara*. *Plant Molecular Biology* 44: 581-589.
- Nguyen, T.B.T., Ketsa, S., van Doorn, W.G. 2004. Effect of modified atmosphere packaging on chilling-induced peel browning in banana. *Postharvest Biology and Technology* 31: 313–317.
- Nguyen, T.B.T., Ketsa, S., van Doorn, W.G. 2003. Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. *Postharvest Biology and Technology* 30: 187–193.
- Nicholas, R.O., Williams, D.W., Hunter, P.A. 1994. Investigation of the value of β -glucan-specific fluorochromes for predicting the β -glucan content of the cell walls of zoopathogenic fungi. *Mycological Research* 98: 694-698.
- Nielsen, K.K., Bojsen, K., Roepstorff, P., Mikkelsen, J.D. 1994. A hydroxyproline-containing class IV chitinase of sugar beet is glycosylated with xylose. *Plant Molecular Biology* 25: 241-257.
- Nielsen, K.K., Mikkelsen, J.D., Kragh, K.M., Bojsen, J. 1993. An acidic class III chitinase in sugar beet: induction by *Cervospora beticola*, characterization and expression in transgenic tobacco plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6: 495-506.
- Nilo, R., Saffie, C., Lilley, K., Baeza-Yates, R., Cambiazo, V., Campos-Vargas, R., González, M., Meisel, L.A., Retamales, J., Silva, H., Orellana, A. 2010. Proteomic analysis of peach fruit mesocarp softening and chilling injury using difference gel electrophoresis (DIGE). *BMC Genomics* 11: 43.
- Nilsen, E.T., Orcutt, D.M. 1996. *Physiology of plants under stress: Abiotic factors*. Vol.1, John Wiley & Sons, INC, New York. pp. 704.
- Nomura, K., Ogasawara, Y., Uemukai, H., Yoshida, M., Hyodo, H., Watada, A.E. 1995. Change of sugar content in chestnut during low temperature storage. *Acta Horticulturae* 398: 265-276.
- Notredame, C., Higgins, D.G., Heringa, J. 2000. T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. *Journal of Molecular Biology* 302: 205-217.
- Nurnberger, T., Scheel, D. 2001. Signal transmission in the plant immune response. *Trends in Plant Science* 6: 372-379.
- O'Hare, T.J., Prasad, A. 1993. The effect of temperature and carbon dioxide on chilling symptoms in mango. *Acta Horticulturae* 343: 244–250.
- Obregón, P., Martín, R., Sanz, A., Castresana, C., 2001. Activation of defence-related genes during senescence: a correlation between gene expression and cellular damage. *Plant Molecular Biology* 46: 67-77.
- Ochse, J.J., Soule J.M.J., Dijkman M.J., Wehlburg, C. 1974. Otros Cultivos Frutales. En: *Cultivo y Mejoramiento de Plantas Tropicales y Subtropicales*. Editorial Limusa, México. pp: 587-818.
- Ogundiwin, E.A., Marti, C., Forment, J., Pons, C., Granell, A., Gradziel, T.M., Peace, C.P., Crisosto, C.H. 2008. Development of ChillPeach genomic tools and identification of cold-responsive genes in peach fruit. *Plant Molecular Biology* 68: 379-397.
- Oh, H.Y., Yang, M.S. 1995. Nucleotide sequence of genomic DNA encoding the potato β -1,3-glucanase. *Plant Physiology* 107: 10032-10889.

- Oh, S.J., Song, S.I., Kim, Y.S., Jang, H.J., Kim, S.Y., Kim, M., Kim, Y.K., Nahm, B.H., Kim, J.K. 2005. *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiology* 138: 341–351.
- Ohme-Takagi, M., Meins, F. J., Shinshi, H. 1998. A tobacco gene encoding a novel basic class II chitinase: a putative ancestor of basic class I and acidic class II chitinase genes. *Molecular and General Genetics* 259: 511–515.
- Ohme-Takagi, M., Shinshi, H. 1995. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *The Plant Cell* 7: 173–182.
- Oikawa, A., Itoh, E., Ishihara, A., Iwamura, H. 2003. Purification and characterization of beta-N-acetylhexosaminidases from maize seedlings. *Journal of Plant Physiology* 160: 991–999.
- Okinaka, Y., Mimori, K., Takeo, K., Kitamura, S., Takeuchi, Y., Yamaoka, N., Yoshikawa, M.A. 1995. Structural model for the mechanisms of elicitor release from fungal cell walls by plant β -1,3-endoglucanase. *Plant Physiology* 109: 839–845.
- Okushima, Y., Koizumi, N., Kusano, T., Sano, H. 2000. Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* 42: 479–488.
- Olien, C. R., Smith, M. N. 1977. Ice adhesions in relation to freezing stress. *Plant Physiology* 60: 499–503.
- Olien, C.R., Clark, J.L. 1995. Freeze-induced changes in carbohydrates associated with hardness of barley and rye. *Crop Science* 35: 496–502.
- Olson, T.S., Bamberger, M.J., Lane, M.D. 1988. Post-translational changes in tertiary and quaternary structure for the insulin proreceptor. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 7342–7351.
- Omero, C., Horwitz, B.A., Chet, I. 2001. A convenient fluorometric method for the detection of extracellular N-acetylglucosaminidase production by filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods* 43: 165–169.
- Oono, Y., Seki, M., Nanjo, T., Narusaka, M., Fujita, M., Satoh, R., Satou, M., Sakurai, T., Ishida, J., Akiyama, K., Iida, K., Maruyama, K., Satoh, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2003. Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* 34: 868–887.
- Ori, N., Sessa, G., Lotan, T., Himmelhoch, S., Fluhr, R. 1990. A major stylar matrix polypeptide (Sp41) is a member of the pathogenesis-related protein superclass. *The EMBO Journal* 9: 3429–3436.
- Ornum, J.V. 1992. Shrimp waste-must it be wasted. *Infofish International* 6: 48–52.
- Örvar, B.L., Sangwan, V., Omann, F., Dhindsa, R.S. 2000. Early steps in cold sensing by plant cells: Role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *The Plant Journal* 23: 785–794.
- Osborn, A.E. 1999 Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens: a commentary. *Fungal Genetics and Biology* 26: 163–168.
- Otha, M., Yamagami, T., Funatsu, G. 1995. Purification and characterization of two chitinases from the leaves of pokeweed (*Phytolacca americana*). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 59: 656–661.
- Palma, T., Aguilera, J.M., Stanley, D.W. 1993. A review of postharvest events in cherimoya. *Postharvest Biology and Technology* 2: 187–208.
- Palomares, O., Villalba, M., Quiralte, J., Polo, F., Rodríguez, R. 2005. 1,3- β -glucanases as candidates in latex-pollen-vegetable food cross-reactivity. *Clinical and Experimental Allergy* 35: 345–351.
- Palonen, P., Buszard, D., Donnelly, D. 2000. Changes in carbohydrates and freezing tolerance during cold acclimation of red raspberry cultivars grown in vitro and in vivo. *Physiologia Plantarum* 110: 393–401.
- Palta, J.P., Whitaker, B.D. and Weis, L. 1993. Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of *Solanum* species. *Plant Physiology* 103: 793–803.
- Panagou, D., Orr, M.D., Dunstone, J.R., Blakley, R.L. 1972. Cobamides and ribonucleotide reduction. IX. Monomeric, allosteric enzyme with a single polypeptide chain. Ribonucleotide reductase of *Lactobacillus leichmannii*. *Biochemistry* 11: 2378–2388.
- Panis, B., Strosse, H., Van Den Hende, S., Swennen, R. 2002. Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem cultures. *CryoLetters* 23: 375–384.

- Papageorgiou, G.C., Murata, N. 1995). The unusually strong stabilizing effects of glycinebetaine on the structure and function in the oxygen evolving photosystem II complex. *Photosynthesis Research* 44: 243–252.
- Pardo, O.A. 2001. Efecto de fungicidas naturales [Primafresh 31, BC-1000, Frutiver 6.1] sobre el procesamiento en fresco de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) orgánica cv. Concha Lisa y comparación del comportamiento entre chirimoya de producción orgánica y convencional en almacenaje refrigerado. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso, Chile. pp. 85.
- Pardossi, A., Vernieri, P., Tognoni, F. 1992. Involvement of abscisic acid in regulating water status in *Phaseolus vulgaris* L. during chilling. *Plant Physiology* 100: 1243-1250.
- Parkin, K.L., Marangoni, A., Jackman, R.L., Yada, R.Y., Stanley, D.W. 1989. Chilling injury. A review of possible mechanisms. *Journal of Food Biochemistry* 13: 127-153.
- Passarinho, P.A., de Vries, S.C. 2002. *Arabidopsis* chitinases: a genomic survey. En: *The Arabidopsis book*. Somerville, C.R, Meyerowitz, E.M. (eds.), American Society of Plant Biologists, Rockville. pp: 1–25.
- Passarinho, P.A., Van Hengel, A.J., Frasz, P.F., de Vries, S.C. 2001. Expression pattern of the *Arabidopsis thaliana* AtEP3/AtchiIV endochitinase gene. *Planta* 212: 556-567.
- Patel, A.K., Singh, V.K., Yadav, R.K., Moir, A.J.G, Jagannadham, M.V. 2009. ICChI, a glycosylated chitinase from the latex of *Ipomoea carnea*. *Phytochemistry* 70: 1210–1216.
- Patil, R.S., Ghormade, V., Deshpande, M.V. 2000. Chitinolytic enzymes: An exploration. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 473-483.
- Patterson, B.D., Kenrick, J.R., Raison, J.K. 1978. Lipids of chill-sensitive and chill-resistant passiflora species - fatty-acid composition and temperature-dependence of spin label motion. *Phytochemistry* 17: 1089-1092.
- Paull, R.E., Chen, N.J. 2000. Heat treatment and fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology* 21: 21–37.
- Paull, R.E. 1990. Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin. En: *Chilling injury of horticultural crops*. Wang, C.Y (ed.), CRC Press, Boca Ratón Florida. pp: 18-36.
- Payne, G., Ward, E., Gaffney, T., Goy, P.A., Moyer, M., Harper, A., Meins, F. J., Ryals, J. 1990. Evidence for a third structural class of β -1,3-glucanase in tobacco. *Plant Molecular Biology* 15: 797-808.
- Payton, P., Webb, R., Korniyev, D., Allen, R., Holaday, A.S. 2001. Protecting cotton photosynthesis during moderate chilling at high light intensity by increasing chloroplastic antioxidant enzyme activity. *Journal of Experimental Botany* 52: 2345-2354.
- Pearce, R.S., Dunn, M.A., Rixon, J.E., Harrison, P., Hughes, M.A. 1996. Expression of cold-inducible genes and frost hardiness in the crown meristem of young barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Igri) plants grown in different environments. *Plant, Cell and Environment* 19: 275–290.
- Pegg, G.F. 1988. Chitinase from tomato *Lycopersicon esculentum*. *Methods of Enzymology* 161: 484-489.
- Penninckx, I.A.M.A., Eggermont, K., Terras, F.R.G., Thomma, B.P.H.J., de Samblanx, G.W., Buchala, A., Métraux, J.P., Manners, J.M., Broekaert, W.F. 1996. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *The Plant Cell* 8: 2309-2323.
- Pentzke, M.A. 2006. Efecto del oxígeno ionizado y el triacilglicerol en la calidad de poscosecha de frutos de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) cv. Concha lisa, provenientes de altas y bajas densidades de plantación, en almacenaje refrigerado. Tesis Doctoral. Universidad Católica de Valparaíso. Chile. pp. 92. (http://ucv.altavoz.net/prontus_unidacad/site/artic/20061127/asocfile/20061127133924/pentzke_monika.pdf)
- Pérez, A.G., Sanz, C. 2001. Effect of high-oxygen and high-carbon-dioxide atmospheres on strawberry flavor and other quality traits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2370-2375.
- Pérez-Munuera, I., Hernando, I., Larrea, V., Besada, C., Arnal, L., Salvador, A. 2009a. Microstructural study of chilling injury alleviation by 1-methylcyclopropene in persimmon. *HortScience* 44: 742-745.
- Pérez-Munuera, I., Quiles, A., Larrea, V., Arnal, L., Besada, C., Salvador, A. 2009b. Microstructure of persimmon treated by hot water to alleviate chilling injury. *Acta Horticulturae* 833: 251-256.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., Cottrell, J.S. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551–3567.

- Pesis, E., Aharoni, D., Aaron, Z., Ben-Arie, R., Aarón, N., Fuchs, Y. 2000. Modified atmosphere and modified humidity packaging alleviates chilling injury symptoms in mango fruits. *Postharvest Biology and Technology* 19: 93-101.
- Pesis, E., Marinansky, R., Zauberman, G., Fuchs, Y. 1994. Prestorage low oxygen atmosphere treatment reduces chilling injury symptoms in 'Fuerte' avocado fruit. *HortScience* 29: 1042-1046.
- Peumans, W.J., Barre, A., Derycke, V., Rougé, P., Zhang, W., May, G.D., Delcour, J.A., Leuven, F.V., Van Damme, E.J.M. 2000. Purification, characterization and structural analysis of an abundant β -1,3-glucanase from banana fruit. *European Journal of Biochemistry* 267: 1188-1195.
- Peumans, W.J., Proost, P., Swennen, R.L., Van Damme, E.J.M. 2002. The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acid for the synthesis of ripening-associated proteins. *Plant Physiology* 130: 1063-1072.
- Philosoph-Hadas, S., Jacob, D., Meir, S., Aharoni, N. 1993. Mode of action of CO₂ in delaying senescence of cheivil leaves. *Acta Horticulturae* 343: 117-122.
- Pihakaski-Maunsbach, K., Tamminen, I., Pietiäinen, M., Griffith, M. 2003. Antifreeze proteins are secreted by winter rye cells in suspension culture. *Physiologia Plantarum* 118: 390-398.
- Pitson, S.M., Seviour, R.J., McDougall, B.M. 1993. Noncellulolytic fungal β -glucanases: their physiology and regulation. *Enzyme and Microbial Technology* 15: 178-192.
- Pócsi, I., Kiss, L., Nánási, P. 1990. Studies on the N-acetyl- β -D-hexosaminidase B from germinating *Lupinus luteus* L. seeds. I. Purification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1039: 110-118.
- Ponath, Y., Vollberg, H., Hahlbrock, K., Kombrink, E. 2000. Two differentially regulated class II chitinase from parsley. *Biological Chemistry* 381: 667-678.
- Ponstein, A.S., Bres-Vloemans, S.A., Sela-Buurlage, M.B., van den Elzen, P.J., Melchers, L.S., Cornelissen, B.J. 1994. A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. *Plant Physiology* 104: 109-118.
- Popenoe, W. 1974. *Manual of tropical and subtropical fruits, excluding the banana, coconut, pineapple, citrus fruits, olive and fig. A Facsimile of the 1920 Edition*. Haffner Press, New York, U.S.A., Collier-Macmillan Publishers, London, U.K. pp. 474.
- Popova, A.V., Busheva, M.R. 1997. Cryoprotective effect of glycine betaine and glycerol is not based on a single mechanism. *Cryoletters* 22: 293-298.
- Porat, R., Pavoncello, D., Peretz, J., Ben-Yehoshua, S., Lurie, S. 2000. Effects of various heat treatments on the induction of cold tolerance and on the postharvest qualities of 'Star Ruby' grapefruit. *Postharvest Biology and Technology* 18: 159-165.
- Porat, R., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Aharoni, N. 2004a. Reduction of postharvest rind disorders in citrus fruit by modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology* 33: 35-43.
- Porat, R., McCollum, T.G., Vinokur, R., Droby, S. 2002a. Effects of various elicitors on the transcription of a β -1,3-glucanase gene in citrus fruits. *Journal of Phytopathology* 150: 70-75.
- Porat, R., Pasentsis, K., Rozentzvieg, D., Gerasopoulos, D., Falara, V., Samach, A., Lurie, S., Kanellis, A.K. 2004b. Isolation of a dehydrin cDNA from orange and grapefruit citrus fruit that is specifically induced by the combination of heat followed by chilling temperatures. *Physiologia Plantarum* 120: 256-264.
- Porat, R., Pavoncello, D., Lurie, S., Mccollum, T.G. 2002b. Identification of a grapefruit cDNA belonging to a unique class of citrus dehydrins and characterization of its expression patterns under temperature stress conditions. *Physiologia Plantarum* 115: 598-603.
- Porat, R., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goren, R., Droby, S. 1999. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest qualities of 'Shamouti' oranges. *Postharvest Biology and Technology* 15: 155-163.
- Porubleva, L., Vander Velden, K., Kothari, S., Oliver, D. J., Chitnis, P. R. 2001. The proteome of maize leaves: Use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide mass fingerprints. *Electrophoresis* 22: 1724-1738.
- Prasad, T.K. 1996. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *The Plant Journal* 10: 1017-1026.

- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A., Stewart, C.R. 1994a. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *The Plant Cell* 6: 65–74.
- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Stewart, C.R., 1994b. Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiology* 105: 619–627.
- Prasanna, V., Prabha, T.N., Tharanathan, R.N. 2007. Fruit ripening phenomena—an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47: 1–19.
- Priem, B., Gitti, R., Bush, C.A., Gross, K.C. 1993. Structure of ten free N-glycans in ripening tomato fruit. *Plant Physiology* 102: 445–458.
- Priestley, D.A., Leopold, A.C. 1979. Relevance of seed membrane-lipids to imbibitional chilling damage. *Physiologia Plantarum* 49: 198–204.
- Privalov, P.L. 1990. Cold denaturation of proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 25: 281–306.
- Prusky, D. 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annual Review of Phytopathology* 34: 413–434.
- Przymusiński, R., Rucińska, R., Gwóźdź, E.A. 2004. Increased accumulation of pathogenesis-related proteins in response of lupine roots to various abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany* 52: 53–61.
- Puhakainen, T., Hess, M.W., Mäkelä, P., Svensson, J., Heino, P., Palva, E.T. 2004. Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 54: 743–753.
- Purvis, A.C., Shewfelt, R.L., Gegogine, J.W. 1995. Superoxide production by mitochondria isolated from green bell pepper fruit. *Physiologia Plantarum* 94: 743–749.
- Purvis, A.C. 1985. Susceptibility of Marsh grapefruit to chilling injury is not related to endogenous calcium levels in flavedo tissue. *Hortscience* 20: 95–96.
- Purvis, A.C., Yelenosky, G. 1982. Sugar and proline accumulation in grapefruit flavedo and leaves during cold hardening of young trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 107: 222–226.
- Qin, G., Meng, X., Wang, Q., Tian, S. 2009. Oxidative damage of mitochondrial proteins contributes to fruit senescence: a redox proteomics analysis. *Journal of Proteome Research* 8: 2449–2462.
- Quan, R., Shang, M., Zhang, H., Zhao, Y., Zhang, J. 2004. Improved chilling tolerance by transformation with betA gene for the enhancement of glycinebetaine synthesis in maize. *Plant Science* 166: 141–149.
- Quirino, B.F., Normanly, J., Amasino, R.M. 1999. Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Molecular Biology* 40: 267–278.
- Racusen, D. 1979. Glycoprotein detection in polyacrylamide gel with thymol and sulfuric acid. *Analytical Biochemistry* 99: 414–476.
- Radhajealakshmi, R., Meena, B., Thangavelu, R., Deborah, S.D., Vidhyasekaran, P., Velazhahan, R. 2000. 45-kDa chitinase purified from pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) shows antifungal activity. *Journal of Plant Diseases and Protection* 107: 605–616.
- Raikhel, N.V., Lee, H.I., Broekaert, W.F. 1993. Structure and function of chitin-binding proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 591–615.
- Raison, J.K. 1974. A biochemical explanation of low temperature stress in tropical and subtropical plants. En: *Mechanisms of regulation of plant growth*. Bialeski, R.L., Ferguson, A.R. (eds.), Bulletin 12, Roy Sol NZ, Wellington. pp: 487–497.
- Raison, J.K., Orr, G.R., 1990. Proposal for a better understanding of the molecular basis of chilling injury. En: *Chilling injury of horticultural crops*. Wang, C.Y (ed.), CRC Press, Boca Ratón Florida. pp: 146–163.
- Rajashekar, C.B., Lafta, A. 1996. Cell-wall changes and cell tension in response to cold acclimation and exogenous abscisic acid in leaves and cell cultures. *Plant Physiology* 111: 605–612.
- Rajashekar, C.B., Burke, M.J. 1996. Freezing characteristics of rigid plant tissues (development of cell tension during extracellular freezing). *Plant Physiology* 111: 597–603.
- Rajashekar, C.B., Zhou, H., Marcum, K.B., Prakash, O. 1999. Glycine betaine accumulation and induction of cold tolerance strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) plants. *Plant Science*, 148: 175–183.

- Rast, D.M., Baumgartner, D., Mayer, C., Hollenstein, G.O. 2003. Cell wall-associated enzymes in fungi. *Phytochemistry* 64: 339-366.
- Raymond, J.A., Wilson, P., deVries, A.L. 1989. Inhibition of growth of nonbasal planes in ice by fish antifreezes. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 881-885.
- Receveur-Bréchet, V., Czjzek, M., Barre, A., Roussel, A., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., Rougé, P. 2006. Crystal structure at 1.45-Å resolution of the major allergen endo- β -1,3-glucanase of banana as a molecular basis for the latex-fruit syndrome. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 63: 235-242.
- Redolfi, P. 1983. Occurrence of pathogenesis-related (b) and similar proteins in different plant species. *Netherlands journal of plant pathology* 89: 245-254.
- Reese, E.T., Mandels, M. 1959. β -D-1,3-glucanases in fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 5: 173-185.
- Regalado, A.P., Pinheiro, C., Vidal, S., Chaves, I., Ricardo, C.P.P., Rodriues-Pousada, C. 2000. The *Lupinus albus* class-III chitinase gene, *IF3*, is constitutively expressed in vegetative organs and developing seeds. *Planta* 210: 543-550.
- Reginato, G., Lizana, L. A. 1980. Comportamiento de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) cv. Concha Lisa en almacenaje refrigerado. *Simiente* 50: 138-145.
- Remón, S., Ferrer, A., López-Buesa, P., Oria, R. (2004). Atmosphere composition effects on Burlat cherry colour during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84: 140-146.
- Remón, S., Ferrer, A., Marquina, P., Burgos, J., Oria, R. 2000. Use of modified atmospheres to prolong the postharvest life of Burlat cherries at two different degrees of ripeness. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1545-1552.
- Ren, Y., Wee, K.E., Chang, F.N. 2000. Deficiency of current methods in assaying endochitinase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 268: 302-305.
- Rep, M., Dekker, H.L., Vossen, J.H., de Boer, A.D., Houterman, P.M., Speijer, D., Back, J.W., de Koster, C.G., Cornelissen, B.J. 2002. Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. *Plant Physiology* 130: 904-17.
- Retamales, J., Cooper, T., Streif, J., Kama, J.C. 1992. Preventing cold storage disorders in nectarines. *The Journal of Horticultural Science* 67: 619-626.
- Reyes-Díaz, M., Ulloa, N., Zúñiga-Feest, A., Gutiérrez, A., Gidekel, M., Alberdi, M., Corcuera, L.J., Bravo, L.A. 2006. *Arabidopsis thaliana* avoids freezing by supercooling. *Journal of Experimental Botany* 57: 3687-3696.
- Rezzonico, E., Flury, N., Meins, F.J., Beffa, R. 1998. Transcriptional down-regulation by abscisic acid of pathogenesis-related β -1,3-glucanase genes in tobacco tissue and cell cultures. *Plant Physiology* 117: 585-592.
- Rhodes, D., Hanson, A.D. 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 44: 357-384.
- Ricard, J., Meunier, J.C., Buc, J. 1974. Regulatory behavior of monomeric enzymes. I. The mnemonic enzyme concept. *European Journal of Biochemistry* 49: 195-208.
- Ricard, J., Cornish-Bowden, A. 1987. Co-operative and allosteric enzymes: 20 years on. *European Journal of Biochemistry* 166: 255-272.
- Ricard, J., Noat, G. 1985. Kinetic co-operativity of monomeric mnemonic enzymes. The significance of the kinetic Hill coefficient. *European Journal of Biochemistry* 72: 557-564.
- Rivas-Martínez, S., Rivas-Saenz, S. 1996-2009. *Worldwide Bioclimatic Classification System*. Phytosociological Research Center, Spain. www.globalbioclimatics.org/station/es-almu1.htm.
- Robbins, P.W., Albright, C., Benfield, B. 1988 Cloning and expression of a *Streptomyces plicatus* chitinase (chitinase-63) in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 443-447.
- Roberts, W.K., Selitrennikoff, C.P. 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Journal of General Microbiology* 134: 169-176.
- Roberts, W.K., Selitrennikoff, C.P. 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Journal of General Microbiology* 134: 169-176.

- Robinson, S.P., Jacobs, A.K., Dry, I.B. 1997. A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. *Plant Physiology* 114: 771-778.
- Roby, D., Broglie, K., Cressman, R., Biddle, P., Chet, I., Broglie, R. 1990. Activation of a bean chitinase promoter in transgenic tobacco plants by phytopathogenic fungi. *The Plant Cell* 2: 999-1007.
- Rodov, V., Ben-Yehoshua, S., Albagli, R., Fang, D.Q. 1995. Reducing chilling injury and decay of stored citrus fruit by hot water dips. *Postharvest Biology and Technology* 5: 119-127.
- Roitsch, T. 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 198-206.
- Romeis, T. 2001. Protein kinases in the plant defence response. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 407-414.
- Romero, G.O., Simmons, C., Yaneshita, M., Doan, M., Thomas, B.R., Rodriguez, R.L. 1998 Characterization of rice endo-beta-glucanase genes (Gns2-Gns14) defines a new subgroup within the gene family. *Gene* 223: 311-320.
- Romero, I., Fernandez-Caballero, C., Goñi, O., Escribano, M.I., Merodio, C., Sanchez-Ballesta, M.T. 2008. Functionality of a class I beta-1,3-glucanase from skin of table grapes berries. *Plant Science* 174: 641-648.
- Romero, I., Sanchez-Ballesta, M.T., Maldonado, R., Escribano, M.I., Merodio, C. 2006. Expression of class I chitinase and β -1,3-glucanase genes and postharvest fungal decay control of table grapes by high CO₂ pretreatment. *Postharvest Biology and Technology* 41: 9-15.
- Roos, W. 2001. Confocal pH topography in plant cells – shifts of proton distribution are involved in plant signalling. En: *Handbook of plant growth – pH as a major variable in plant growth*. Rengel, Z. (ed.), New York. pp: 55-86.
- Roos, W. 2000. Ion mapping in plant cells – methods and applications in signal transduction research. *Planta* 210: 347-370.
- Rorat, T. 2006. Plant dehydrins. Tissue location, structure and function. *Cellular and Molecular Biology Letters* 11: 536-556.
- Rosinger, C.H., Wilson, J.M., Kerr, W. 1984. Changes in the soluble protein and free amino acid content of chill-sensitive and chill-resistant plants during chilling and hardening treatments. *Journal of Experimental Botany* 35: 1460-1471.
- Roy Choudhury, S., Roy, S., Sengupta, D.N. 2009. Characterization of cultivar differences in β -1,3 glucanase gene expression, glucanase activity and fruit pulp softening rates during fruit ripening in three naturally occurring banana cultivars. *Plant Cell Reports* 28: 1641-1653.
- Royer, V., Fraichard, S., Bouhin, H. 2002. A novel putative insect chitinase with multiple catalytic domains: hormonal regulation during metamorphosis. *Biochemical Journal* 366: 921-928.
- Rozenzweig, D., Elmaci, C., Samach, A., Lurie, S., Porat, R. 2004. Isolation of four heat shock protein cDNAs from grapefruit peel tissue and characterization of their expression in response to heat and chilling temperature stresses. *Physiologia Plantarum* 121: 421-428.
- Ruelland, E., Vaultier, M.N., Zachowski, A., Hurry, V. 2009. Cold signalling and cold acclimation in plants. *Advances in Botanical Research* 49: 35-150.
- Ruiz-Sanchez, A., Cruz-Camarillo, R., Salcedo-Hernandez, R., Ibarra, J.E., Barboza-Corona, J.E. 2005 Molecular cloning and purification of an endochitinase from *Serratia marcescens* (Nima). *Molecular Biotechnology* 31: 103-111.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E. 1998. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 311-315.
- Rushton, P.J., Torres, J.T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., Somssich, I.E. 1996. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *The EMBO Journal* 15: 5690-5700.
- Ryals, J., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., Hunt, M.D. 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8: 1809-1819.
- Ryan, C.A., Farmer, E.E. 1991. Oligosaccharide signals in plants: a current assessment. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 651-674.

- Ryu, S.B., Li, P.H. 1994. Potato cold hardiness development and abscisic acid. I: Conjugated abscisic acid is not the source of the increase in free abscisic acid during potato (*Solanum commersonii*) cold acclimation. *Physiologia Plantarum* 90: 15-20.
- Sabehat, A., Weiss, D., Lurie, S. 1998 Heat-shock proteins and cross-tolerance in plants. *Physiologia Plantarum* 103: 437-441.
- Sabehat, A., Weiss, D., Lurie, S. 1996. The correlation between heat-shock protein accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruit. *Plant Physiology* 110: 531-537.
- Sacandé, M., Golovina, E.A., van Aelst, A.C., Hoekstra, F.A. 2001. Viability loss of neem (*Azadirachta indica*) seeds associated with membrane phase behaviour. *Journal of Experimental Botany* 52: 919-931.
- Sahai, A.S., Manocha, M.S. 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiology Review* 11: 317-338.
- Saito, A., Fujii, T., Yoneyama, T., Redenbach, M., Ohne, T., Watanabe, T., Miyashita K. 1999. High multiplicity of chitinase genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 63: 710-718.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sakamoto, A., Murata, N. 2001. The use of bacterial choline oxidase, a glycinebetaine-synthesizing enzyme, to create stress-resistant transgenic plants. *Plant Physiology* 125: 180-188.
- Sakharov, I.Y., Sakharova, I.V. 2002. Extremely high stability of African oil palm tree peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 29: 108-114.
- Sakuda, S., Isogai, A., Matsumoto, S., Suzuki, A. 1986. The structure of allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor, produced by *Streptomyces* Sp. *Tetrahedron Letters* 27: 2475-2478.
- Sala, J.M. 1998. Involvement of oxidative stress in chilling injury in coldstored mandarin fruits. *Postharvest Biology and Technology* 13: 255-261.
- Sala, J.M., Lafuente, M.T. 1999. Catalase in the heat-induced chilling tolerance of cold-stored Hybrid Fortune mandarin fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 2410-2414.
- Sala, J.M., Sanchez-Ballesta, M.T., Alferez, F., Mulas, M., Zacarias, L., Lafuente, M.T. 2005. A comparative study of the postharvest performance of an ABA-deficient mutant of oranges II. Antioxidant enzymatic system and phenylalanine ammonia-lyase in non-chilling and chilling peel disorders of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 37: 232-240.
- Saltveit, M.E. 1999. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 15: 279-292.
- Saltveit, M.E. 2005. Influence of heat shocks on the kinetics of chilling-induced ion leakage from tomato pericarp discs. *Postharvest Biology and Technology* 36: 87-92.
- Saltveit, M.E., Morris, L.L. 1990. Overview on chilling injury of horticultural crops. En: *Chilling injury of horticultural crops*. Wang, C.Y (ed.), CRC Press, Boca Ratón Florida. pp: 3-16.
- Salzer, P., Hebe, G., Hager, A. 1997. Cleavage of chitinous elicitors from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme* by host chitinases prevents induction of K⁺ and Cl⁻ release, extracellular alkalinisation and H₂O₂ synthesis of *Picea abies* cells. *Planta* 203: 470-479.
- Salzman, R.A., Tikhonova, I., Bordelon, B.P., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. 1998. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiology* 117: 465-72.
- Samyn, B., Sergeant, K., Carpentier, S., Debyser, G., Panis, B., Swennen, R., Van Beeumen, J. 2007. Functional proteome analysis of the banana plant (*Musa* spp.) using *de novo* sequence analysis of derivatized peptides. *Journal of Proteome Research* 6: 70-80.
- Samyn, B., Sergeant, K., Memmi, S., Debyser, G., Devreese, B., Van Beeumen, J. 2006. MALDI-TOF/TOF *de novo* sequence analysis of 2-D PAGE-separated proteins from *Halorhodospira halophila*, a bacterium with unsequenced genome. *Electrophoresis* 27: 2702-2711.

- Sanchez-Ballesta M.T., Rodrigo M.J., Lafuente M.T., Granell A., Zacarias L. 2004. Dehydrin from citrus, which confers in vitro dehydration and freezing protection activity, is constitutive and highly expressed in the flavedo of fruit but responsive to cold and water stress in leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1950-1957.
- Sanchez-Ballesta, M.T., Lluch, Y., Gosalbes, M.J., Zacarias, L., Granell, A., Lafuente, M.T. 2003. A survey of genes differentially expressed during long-term heat-induced chilling tolerance in citrus fruit. *Planta* 218: 65-70.
- Sanchez-Ballesta, M., Romero, I., Bernardo, J., Orea, J., González-Ureña, A., Escribano, M., Merodio, C. 2007. Involvement of the phenylpropanoid pathway in the response of table grapes to low temperature and high CO₂ levels. *Postharvest Biology and Technology* 46: 29-35.
- Sanchez-Ballesta, M.T., Lafuente, M.T., Zacarias, L., Granell, A., 2000. Involvement of phenylalanine ammonia-lyase in the response of 'Fortune' mandarin fruits to cold temperature. *Physiologia Plantarum* 108: 382-389.
- Sanchez-Ballesta, M.T, Gosalbes, M.J., Rodrigo, M.J., Granell, A., Zacarias, L., Lafuente, M.T. 2006. Characterization of a β -1,3-glucanase from citrus fruit as related to chilling-induced injury and ethylene production. *Postharvest Biology and Technology* 40: 133-140.
- Sanchez-Monge, R., Blanco, C., Díaz-Perales, A., Collada, C., Carrillo, T., Aragoncillo, C., Salcedo G. 1999. Isolation and characterization of major banana allergens: identification as fruit class I chitinases. *Clinical Experimental Allergy* 29: 673-80.
- Sangwan, V., Foulds, I., Singh, J., Dhindsa, R.S. 2001. Cold-activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca⁺² influx. *The Plant Journal* 27: 1-12.
- Santarius, K.A., Bauer, J. 1983. Cryopreservation of spinach chloroplast membranes by low-molecular-weight carbohydrates, I. *Cryobiology* 20: 83-89.
- Santos, I.S., Da Cunha, M., Machado, O.L.T., Gomes, V.M. 2004. A chitinase from *Adenanthera pavonina* L. seeds: purification, characterisation and immunolocalisation. *Plant Science* 167: 1203-1210.
- Sapitnitskaya, M., Maul, P., McCollum, G.T., Guy, C.L., Weiss, B., Samach, A., Porat, R. 2006. Postharvest heat and conditioning treatments activate different molecular responses and reduce chilling injuries in grapefruit. *Journal of Experimental Botany* 57: 2943-2953.
- Saravanan, R.S., Rose, J.K. 2004. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* 4: 2522-2532.
- Sarry, J.E., Sommerer, N., Sauvage, F.X., Bergoin, A., Rossignol, M., Albagnac, G., Romieu, C. 2004. Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp. *Proteomics* 4: 201-215.
- Sasaki, C., Itoh, Y., Takehara, H., Kuhara, S., Fukamizo, T. Family 19 chitinase from rice (*Oryza sativa* L.): substrate-binding subsites demonstrated by kinetic and molecular modeling studies. *Plant Molecular Biology* 52: 43-52.
- Satoh, R., Nakashima, K., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2002. ACTCAT, a novel *cis*-acting element for proline- and hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene encoding proline dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 130: 709-719.
- Sauquet, H., Doyle, J.A., Scharaschkin, T., Borsch, T., Hilu, K.W., Chatrou, L.W., Thomas, A.L. 2003. Phylogenetic analysis of *Magnoliales* and *Myristicaceae* based on multiple data sets: implications for character evolution. *Botanical Journal of the Linnean Society* 142: 125-186.
- Scandalios, J.G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* 101: 7-12.
- Schaller, A., Oecking, C. 1999. Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *The Plant Cell* 11: 263-272.
- Schirra, M., D'hallewin, G. 1997. Storage performance of Fortune mandarins following hot water dips. *Postharvest Biology and Technology* 10: 229-238.
- Schirra, M., Cohen, E. (1999) Long-term storage of 'Olinda' oranges under chilling and intermittent warming temperatures. *Postharvest Biology and Technology* 16: 63-69.
- Schlumberg, A., Match, F., Vögeli, U., Boller, T. 1986. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 324: 365-367.
- Schmidt, W.E., Ebel, J. 1987. Specific binding of a fungal glucan phytoalexin elicitor to membrane fractions from soybean *Glycine max*. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 4117-4121.

- Schotsmans, W., Molana, A., MacKay, B. 2007. Controlled atmosphere storage of rabbiteye blueberries enhances postharvest quality aspects. *Postharvest Biology and Technology* 44: 277–285.
- Schraudner, M., Ernst, D., Langebartels, C., Sandermann, H. 1992. Biochemical plant responses to ozone. III. Activation of the defence-related proteins β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. *Plant Physiology* 99: 1321–1328.
- Schultze, M., Staehelin, C., Brunner, F., Genetet, I., Legrand, M., Fritig, B., Kondorosi, E., Kondorosi, A. 1998. Plant chitinase/lysozyme isoforms show distinct substrate specificity and cleavage site preference towards lipochitooligosaccharide Nod signals. *The Plant Journal* 16: 571–580.
- Schwarz, W.H., Bronnenmeier, K., Krause, B., Lottspeich, F., Staudenbauer, W.L. 1995. Debranching of arabinoxylan: properties of the thermoactive recombinant α -L-arabinofuranosidase from *Clostridium stercorarium* (ArfB). *Applied Microbiology and Biotechnology* 43: 856–860.
- Segel, I.H. 1993. *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems*. Wiley, New York. pp. 992.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M.A., Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 941–950.
- Selvarajah, S., Bauchot, A.D., John, P. 2001. Internal browning in cold stored pineapples is suppressed by a postharvest application of 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biology and Technology* 23: 167–170.
- Serek, M., Tamari, G., Sisler, E.C., Borochoy, A. 1995. Inhibition of ethylene induced cellular senescence symptoms by 1-methylcyclopropene, a new inhibitor of ethylene action. *Physiologia Plantarum* 94: 229–232.
- Serrano, M., Martínez-Madrid, M.C., Pretel, M.T., Riquelme, F., Romojaro, F. 1997. Modified atmosphere packaging minimizes increases in putrescine and abscisic acid levels caused by chilling injury in pepper fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 1668–1672.
- Sevillano, L., Sanchez-Ballesta, M.T., Romojaro, F., Flores, F.B. 2009. Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 555–573.
- Sevillano, L. 2007. *Expresión de proteínas de estrés de bajo peso molecular (sHSPs en mesocarpio de chirimoya (Annona cherimola Mill))*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, España. pp. 207. (<http://hera.ugr.es/tesisugr/16881345.pdf>)
- Sharp, J.K., Valent, B., Albersheim, P. 1984. Purification and partial characterization of a β -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *The Journal of Biological Chemistry* 259: 11312–11320.
- Shen, W., Nada, K., Tachibana, S. 2000. Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars. *Plant Physiology* 124: 431–439.
- Shen, Z., Jacobs-Lorena, M. 1999. Evolution of chitin-binding proteins in invertebrates. *Journal of Molecular Evolution* 48: 341–347.
- Shenoy, S.R., Shiva Kameshwari, M.N., Swaminathan, S., Gupta, M.N. 2006. Major antifungal activity from the bulbs of Indian squill *Urginea indica* is a chitinase. *Biotechnology Progress* 22: 631–637.
- Shevchenko, A. 2001. Evaluation of the efficiency of in-gel digestion of proteins by peptide isotopic labelling and MALDI mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 296: 279–283.
- Shi, Y., Zhang, Y., Shih, D.S. 2006. Cloning and expression analysis of two β -1,3-glucanase genes from strawberry. *Journal of Plant Physiology* 163: 956–967.
- Shih, C.Y.T., Khan, A.A., Jia, S., Wu, J., and Shih, D.S. 2001. Purification, Characterization, and Molecular Cloning of a Chitinase from the Seeds of *Benincasa hispida*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65: 501–509.
- Shikama, K., Yamazaki, I. 1961. Denaturation of catalase by freezing and thawing. *Nature* 190: 83–84.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 217–223.
- Shinshi, H., Mohnen, D., Meins, F.J. 1987. Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme inhibition of chitinase and chitinase messenger RNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 89–93.

- Shinshi, H., Neuhaus, J.M., Ryals, J., Meins, F.J. 1990. Structure of a tobacco endochitinase gene: evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequences encoding a cysteine-rich domain. *Plant Molecular Biology* 14: 357-368.
- Shinshi, H., Usami, S., Ohme-Takagi, M. 1995. Identification of an ethylene responsive responsive region in the promoter of a tobacco class I chitinase gene. *Plant Molecular Biology* 27: 923-932.
- Shinshi, H., Kato, K. 1983. Physical and chemical properties of 1,3- β -glucanase from cultured tobacco cells. *Agricultural and Biological Chemistry* 47: 1455-1460.
- Shukla, L.I., Chinnusamy, V., Sunkar, R. 2008. The role of microRNAs and other endogenous small RNAs in plant stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta* 1779: 743-748.
- Siddique, M.A., Grossmann, J., Gruissem, W., Baginsky, S. 2006. Proteome analysis of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) chromoplasts. *Plant and Cell Physiology* 47: 1663-1673.
- Siddiqui, K.S., Cavicchioli, R. 2006. Cold-Adapted Enzymes. *Annual Review of Biochemistry* 75: 403-433.
- Sidebottom, C., Buckley, S., Pudney, P., Twigg, S., Jarman, C., Holt, C., Telford, J., McArthur, A., Worrall, D., Hubbard, R., Lillford, P. 2000. Heat-stable antifreeze protein from grass. *Nature* 406: 256.
- Siegel, D.P. 1987. Membrane-membrane interactions via intermediates in lamellar-to-inverted hexagonal phase transitions. En: *Cell Fusion*. Sowers, A.E. (ed.), Plenum Press, New York. pp: 181-207.
- Simmons, C.R. 1994. The physiology and molecular biology of plant 1,3- β -Dglucanases and 1,3;1,4- β -D-glucanases. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13: 325-387.
- Simpson, G.M. 1981. The value of physiological knowledge of water stress in plants. En: *Water stress on plants*. Simpson, G.M. (ed.), Praeger, New York. pp: 235-265.
- Singh, A., Kirubakaran, S.I., Sakthivel, N. 2007. Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat. *Protein Expression and Purification* 56: 100-109.
- Singh, S.P., Pal, R.K. 2008. Controlled atmosphere storage of guava (*Psidium guajava* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 47: 296-306.
- Smith, T.A. 1985. Polyamines. *Annual Review of Plant Physiology* 36: 117-143.
- Smith, M.A., Davies P.J. 1985. Separation and quantitation of polyamines in plant tissues by high performance liquid chromatography of their dansyl derivatives. *Plant Physiology* 78: 89-91.
- Soderhall, K., Unestam, T. 1975. Properties of extracellular enzymes from *Aphanomyces astaci* and their relevance in the penetration process of crayfish cuticle. *Physiologia Plantarum* 35: 40-46.
- Sola, M.M., Gutiérrez, M., Vargas, A.M. 1994. Regulation of hexose-phosphate cycle determines glucose and fructose accumulation in cherimoya (*Annona cherimola* Mill) during ripening. *Journal of Plant Physiology* 144: 569-575.
- Solecka, D., Kacperska, A. 2003. Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold. *Physiologia Plantarum* 119: 253-262.
- Solecka, D., Zebrowski, J., Kacperska, A. 2008. Are pectins involved in cold acclimation and de-acclimation of winter oil-seed rape plants?. *Annals of Botany* 101: 521-530.
- Somssich, I.E., Schmelzer, E., Bollmann, J., Hahlbrock, K. 1986. Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 2427-2430.
- Song, Z., Chen, L., Ganapathy, A., Wan, X.F., Brechenmacher, L., Tao, N., Emerich, D., Stacey, G., Xu, D. 2007. Development and assessment of scoring functions for protein identification using PMF data. *Electrophoresis* 28: 864-870.
- Sonnenberg, A.S.M., Sietsma, J.H., Wessels, J.C.H. 1985. Spatial and temporal differences in the synthesis of (1-3)- β and (1-6)- β linkages in a wall glucan of *Schizophyllum commune*. *Experimental Mycology* 9: 141-148.
- Sonnichsen, F.D., DeLuca, C.I., Davies, P.L., Sykes, B.D., 1996. Refined solution structure of type III antifreeze protein: hydrophobic groups may be involved in the energetics of the protein-ice interaction. *Structure* 4: 1325-1337.

- Soror, S.H., Verma, V., Rao, R., Rasool, S., Koul, S., Qazi, G.N., Cullum, J. 2007. A cold-active esterase of *Streptomyces coelicolor* A3(2): from genome sequence to enzyme activity. *The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34: 525–531.
- Souza, D.S., Grossi-de-As, M.F., Silva, L.P., Franco, O.L., Gomes-Junior, J.E., Oliveira, G.R., Rocha, T.L., Magalhães, C.P., Marra, B.M., Grossi-de-Sa, M., Romano, E., de Sá, C.M., Kombrink, E., Jiménez, A.V., Abreu, L.R. 2008. Identification of a novel beta-N-acetylhexosaminidase (Pcb-NAHA1) from marine Zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa, Zoanthidea). *Protein Expression and Purification* 58: 61–69.
- Sowka, S., Hsich, L.S., Krebitz, M., Akasawa, A., Martin, B.M., Starrett, D., Peterbauer, C.K., Scheiner, O., Breiteneder, H. 1998. Identification and cloning of Prs a 1, a 32 kDa endochitinase and major allergen of avocado, and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *The Journal of Biology Chemistry* 273: 28091–28097.
- Spencer, C.M., Cai, Y., Martin, R., Gaffney, S.H., Goulding, P.N., Magnolato, D., Lilley, T.H., Haslam, E. 1988. Polyphenol complexation—some thoughts and observations. *Phytochemistry* 27: 2397–2409.
- Stamp, N. 2003. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *The Quarterly Review of Biology* 78: 23–55.
- Stanley, D.W. 1991. Biological membrane deterioration and associated quality losses in food tissues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 30: 487–553.
- Steiglitz, H., Stern, H. 1973. Regulation of β -1,3-glucanase activity in developing anthers of *Lilium*. *Developmental Biology* 34: 169–173.
- Steiglitz, H. 1977. Role of β -1,3-glucanase in postmeiotic microspore release. *Developmental Biology* 57: 87–97.
- Steponkus, P.L. 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 543–584.
- Steponkus, P.L., Uemura, M., Joseph, R.A., Gilmour, S.J., Thomashow, M.F. 1998. Mode of action of the COR15a gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 14570–14575.
- Sticher, L., Hinz, U., Meyer, A.D., Meins, F.J. 1992. Intracellular transport and processing of a tobacco vacuolar β -1,3-glucanase. *Planta* 188: 559–565.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., Fritig, B. 1993. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75: 687–706.
- Storer, A.C., Cornish-Bowden, A. 1976. Kinetics of rat liver glucokinase. Co-operative interactions with glucose at physiologically significant concentration. *Biochemical Journal* 159: 7–14.
- Storey, R., Wyn-Jones R.G. 1977. Quaternary ammonium compounds in plants in relation to salt resistance. *Phytochemistry* 21: 777–791.
- Strasser, R., Bondili, J.S., Schoberer, J., Svoboda, B., Liebminger, Glössl, J., Altmann, Steinkellner, H., Mach, L. 2007. Enzymatic properties and subcellular localization of *Arabidopsis* β -N-acetylhexosaminidases. *Plant Physiology* 145: 5–16.
- Stroppolo, M.E., Falconi, M., Caccuri, A.M., Desideri, A. 2001. Superefficient enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 1451–1460.
- Suárez, V., Staehelin, C., Arango, R., Holtorf, H., Hofsteenge, J., Meins, F.J. 2001. Substrate specificity and antifungal activity of recombinant tobacco class I chitinases. *Plant Molecular Biology* 45:609–618.
- Sung, D.Y., Vierling, E., Guy, C.L. 2001. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* HSP70 gene family. *Plant Physiology* 123: 789–800.
- Sunyaev, S., Liska, A., Golod, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A. 2003. MultiTag: Multiple error-tolerant sequence tag search for the sequence-similarity identification of proteins by mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 75: 1307–1315.
- Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S., Suzuki, M. 1986. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydrate Research* 151: 403–408.
- Suzuki, K., Fukuda, Y., Shinshi, H. 1995. Studies on elicitor-signal transduction leading to differential expression of defense genes in cultured tobacco cells. *Plant and Cell Physiology* 36: 281–289.

- Suzuki, K., Sugawara, N., Suzuki, M., Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Watanabe, T. 2002. Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: Enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 66: 1075-1083.
- Svitil, A.L., Chadhain, S.M.N., Moore, J.A., Kirchman, D.L. 1997. Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 408-413.
- Szabados, L., Savaouré, A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15: 89-97.
- Tabei, Y., Kitade, S., Nishizawa, Y., Kikuchi, N., Kayano, T., Hibi, T., Akutsu, K. 1998. Transgenic Cucumber Plants Harboring a Rice Chitinase Gene Exhibit Enhanced Resistance to Gray Mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Cell Reports* 17: 159-164.
- Taira, T., Hayashi, H., Tajiri, Y., Onaga, S., Uechi, G., Iwasaki, H., Ohnuma, T., Fukamizo, T. 2009. A plant class V chitinase from a cycad (*Cycas revoluta*): biochemical characterization, cDNA isolation, and posttranslational modification. *Glycobiology* 19: 1452-1461.
- Taira, T., Ohdomari, A., Nakama, N., Shimoji, M., Ishihara, M. 2005b. Characterization and antifungal activity of gazyumaru (*Ficus microcarpa*) latex chitinases: both the chitin-binding and the antifungal activities of class I chitinase are reinforced with increasing ionic strength. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 69: 811-818.
- Taira, T., Ohnuma, T., Yamaguchi, T., Aso, Y., Ishiguro, M., Ishihara, M. 2002. Antifungal activity of rye (*Secale cereale*) seed chitinases: the different binding manner of class I and class II chitinases to fungal cell walls. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 66: 970-977.
- Taira, T., Toma, N., Ichi, M., Takeuchi, M., Ishihara, M. 2005c. Tissue distribution, synthesis stage, and ethylene induction of pineapple (*Ananas comosus*) chitinases. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 69: 852-854.
- Taira, T., Toma, N., Ishihara, M. 2005a. Purification, characterization and antifungal activity of chitinases from pineapple (*Ananas comosus*) leaf. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 69: 189-196.
- Takken, F.L., Albrecht, M., Tameling, W.I. 2006. Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 383-390.
- Tamas, L., Huttova, J., Zigova, Z. 1997. Accumulation of stress-proteins in intercellular spaces of barley leaves induced by biotic and abiotic factors. *Biologia Plantarum* 39: 387-394.
- Tamiya, T., Okahashi, N., Sakuma, R., Aoyama, T., Akahane, T., Matsumoto, J.J. 1985. Freeze denaturation of enzymes and its prevention with additives. *Cryobiology* 22: 446-456.
- Tanaka, T., Fukui, T., Imanaka, T. 2001. Different cleavage specificities of the dual catalytic domains in chitinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 35629-35635.
- Tang, C.M., Chye, M.L., Ramalingam, S., Ouyang, S.W., Zhao, K.J., Ubhayasekera, W., Mowbray, S.L. 2004. Functional analyses of the chitin-binding domains and the catalytic domain of *Brassica juncea* chitinase BjCHI1. *Plant Molecular Biology* 56: 285-298.
- Tang, W., Zhu, S., Li, L., Liu, D., Irving, D.E. 2010. Differential expressions of PR1 and chitinase genes in harvested bananas during ripening, and in response to ethephon, benzothiadazole and methyl jasmonate. *Postharvest Biology and Technology* 57: 86-91.
- Tannu, N.S., Hemby, S.E. 2007. *De novo* protein sequence analysis of *Macaca mulatta*. *BMC Genomics* 8: 270-279.
- Tasseva, G., de Virville, J.D., Cantrel, C., Moreau, F., Zachowski, A. 2004. Changes in the endoplasmic reticulum lipid properties in response to low temperature in *Brassica napus*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 811-822.
- Taylor, N.L., Heazlewood, J.L., Day, D.A., Millar, A.H. 2005. Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome. *Molecular and Cell Proteomics* 4: 1122-1133.
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Doczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J.L., Hirt, H. 2004. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* 15: 141-152.
- Terras, F.R.G., Schoofs, H., De Bolle, M.F.C., Van Leuven, F., Rees, S.B., Vanderleyden, J., Cammue, B.P.A., Broekaert, W.F. 1992. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 15301-15309.

- Thakur, B.R., Singh, R.K., Handa, A.K., Rao, M.A. 1997. Chemistry and uses of pectin : A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37: 47-73.
- Thalmair, M., Bauw, G., Thiel, S., Doehring, T., Langebartels, C., Sandermann, H.J. 1996. Ozone and ultraviolet B effects on the defense-related proteins β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco. *Journal of Plant Physiology* 148: 222-228.
- Theis, T., Stahl, U. 2004. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61: 437-455.
- Thibaud, M.C., Gineste, S., Nussaume, L., Robaglia, C. 2004. Sucrose increases pathogenesis-related PR-2 gene expression in *Arabidopsis thaliana* through an SA-dependent but NPR1-independent signaling pathway. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 81-88.
- Thomashow, M.F. 1999. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 571-599.
- Thomma, B.P.H.J., Penninckx, I.A.M.A., Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A. 2001. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology* 13: 63-68.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Thornton, J. M. 1981. Disulphide Bridges in Globular Proteins. *Journal of Molecular Biology* 151: 261-287.
- Tiffin, P. 2004. Comparative evolutionary histories of chitinase genes in the genus *Zea* and family *Poaceae*. *Genetics* 167: 1331-1340.
- Tjus, S.E., Scheller, H.V., Andersson, B., Möller, B.L. 2001. Active oxygen produced during selective excitation of photosystem I is damaging not only to photosystem I, but also to photosystem II. *Plant Physiology* 125: 2007-2015.
- Tonón, C., Guevara, G., Oliva, C., Daleo, G. 2002. Isolation of a potato acidic 39 kDa β -1,3-glucanase with antifungal activity against *Phytophthora infestans* and analysis of its expression in potato cultivars differing in their degrees of field resistance. *Journal of Phytopathology* 150: 189-195.
- Torres, M.A., Dangl, J.L., Jones, J.D. 2002. *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 517-522.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 4350-4354.
- Towheed, T.E., Anastassiades, T. 1999. Glucosamine therapy for osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology* 26: 2294-2297.
- Trudel, J., Asselin, A. 1989. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 178: 362-366.
- Truong, N.H., Park, S.M., Nishizawa, Y., Watanabe, T., Sasaki, T., Itoh, Y. 2003. Structure, heterologous expression, and properties of rice (*Oryza sativa* L.) family 19 chitinases. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 67: 1063-1070.
- Tsukamoto, T., Koga, D., Ide, A., Ishibashi, T., Horino-Matsushige, M., Yagishita, K., Imoto, T. 1984. Purification and some properties of chitinases from yam, *Dioscorea opposita* Thumb. *Agricultural and Biological Chemistry* 48: 931-939.
- Tsukaya, H., Ohshima, T., Naito, S., Chino, M., Komeda, Y. 1991. Sugar-dependent expression of the *CSH-A* gene for chalcone synthase from petunia in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 97: 1414-1421.
- Ubhayasekera, W., Rawat, R., Ho, S.W., Wiweger, M., Von Arnold, S., Chye, M.L., Mowbray, S.L. 2009. The first crystal structures of a family 19 class IV chitinase: the enzyme from Norway spruce. *Plant Molecular Biology* 71: 277-289.
- Ubhayasekera, W., Tang, C.M., Ho, S.W., Berglund, G., Bergfors, T., Chye, M.L., Mowbray, S.L. 2007. Crystal structures of a family 19 chitinase from *Brassica juncea* show flexibility of binding cleft loops. *FEBS Journal* 274: 3695-3703.

- Udaya Prakash, N.A., Jayanthi, M., Sabarinathan, R., Kanguane, P., Mathew, L., Sekar, K. 2010. Evolution, Homology Conservation, and Identification of Unique Sequence Signatures in GH19 Family Chitinases. *Journal of Molecular Evolution* 70: 466-478.
- Ueda, M., Kojima, M., Yoshikawa, T., Mitsuda, N., Araki, K., Kawaguchi, T., Miyatake, K., Arai, M., Fukamizo, T. 2003. A novel type of family 19 chitinase from *Aeromonas* sp. No.10S-24. Cloning, sequence, expression, and the enzymatic properties. *European Journal of Biochemistry* 270: 2513-2520.
- Uemura, M., Steponkus, P.L. 1989. Effect of cold acclimation on the incidence of two forms of freezing injury in protoplasts isolated from rye leaves. *Plant Physiology* 91: 1131-1137.
- Uemura, M., Steponkus, P.L. 1997. Effect of cold acclimation on the lipid composition of the inner and outer membrane of the chloroplast envelope isolated from rye leaves. *Plant Physiology* 14: 1493-1500.
- Uemura, M., Joseph, R.A., Steponkus, P.L. 1995. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (effect on plasma membrane lipid composition and freeze induced lesions). *Plant Physiology* 109: 15-30.
- Uemura, M., Tominaga, Y., Nakagawara, C., Shigematsu, S., Minami, A., Kawamura, Y. 2006. Responses of the plasma membrane to low temperatures. *Physiologia Plantarum* 126: 81-89.
- Ukaji, N., Kuwabara, C., Takezawa, D., Arakawa, K., Fujikawa, S. 2004. Accumulation of pathogenesis-related (PR) 10 / Bet v 1 protein homologues in mulberry (*Morus bombycis* Koidz.) tree during winter. *Plant, Cell, and Environment* 27: 1112-1121.
- Upadhyaya, A., Davis, T.D., Walser, R.H., Galbraith, A.B., Sankhla, N. 1989. Uniconazole- induced alleviation of low-temperature damage in relation to antioxidant activity. *Hortscience* 24: 955-957.
- Ushakov, B. 1964. Thermostability of cells and proteins in poikilotherms. *Physiological Reviews* 44: 518-560.
- Valero, D., Martínez-Romero, D., Serrano, M., 2002. The role of polyamines in the improvement of the shelf life of fruit. *Trends in Food Science and Technology* 13: 228-234.
- Van Aalten, D.M., Komander, D., Synstad, B., Gaseidnes, S., Peter, M.G., Eijsink, V.G. 2001. Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 8979-8984.
- Van Breusegem, F., Sooten, L., Stassart, J.M., Botterman, J., Moens, T., Van Montagu, M., Inze, D. 1999. Effects of overproduction of tobacco MnSOD in maize chloroplasts on foliar tolerance to cold and oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 50: 71-78.
- Van Damme, E.J.M., Willems, P., Torrekens, S., Van Leuven, F., Peumans, W.J. 1993. Garlic (*Allium sativum*) chitinases: Characterization and molecular cloning. *Physiologia Plantarum* 87: 177-186.
- Van de Rhee, M.D., Lemmers, R., Bol, J.F. 1993. Analysis of regulatory elements involved in stress-induced and organ-specific expression of tobacco acidic and basic β -1,3-glucanase genes. *Plant Molecular Biology* 21: 451-461.
- Van den Bulcke, M., Bauw, G., Castresana, C., van Montagu, M., Vandekerckhove, J. 1989. Characterization of vacuolar and extracellular β -(1,3)-glucanases of tobacco: Evidence for a strictly compartmentalized plant defense system. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 2673-2677.
- Van Hengel, A.J., Tadesse, Z., Immerzeel, P., Schols, H., van Kammen, A., de Vries, S.C. 2001. N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiology* 125: 1880-1890.
- Van Hengel, A.J., van Kammen, A., De Vries, S.C. 2002. A relationship between seed development, Arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum* 114: 637-644.
- Van Kan, J.A.L. 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* 11: 247-253.
- Van Kan, J.A.L., Joosten, M.H.A.J., Wagemakers, C.A.M., van den Berg-Velthuis, G.C.M., de Wit, P.J.G.M. 1992. Differential accumulation of mRNAs encoding extracellular and intracellular PR proteins in tomato induced by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Plant Molecular Biology* 20: 513-527.
- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162.

- Van Loon, L.C. 1975. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN" IV. Similarity to qualitative changes of specific proteins after infection with different viruses and their relationship to acquire resistance. *Virology* 67: 566-572.
- Van Loon, L.C. 1982. Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defense against virus infection. En: *Active Defense Mechanisms in Plants*. Wood, R.K.S. (ed.), Plenum Press, New York, USA. pp: 247-273.
- Van Loon, L.C. 1999. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. En: *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. Datta, S.K., Muthukrishnan, S. (eds.), CRC Press LLC, Boca Raton, USA. pp: 1-19.
- Van Loon, L.C., Van Kammen, A. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40: 190-211.
- Van Loon, L.C., Van Strien, E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85-97.
- Van Scheltinga, T., Anke, C., Hennig, M., Dijkstra, B.W. 1993. The 1.8 Å resolution structure of hevamine, a plant chitinase/lysozyme, and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18. *Journal of Molecular Biology* 262: 243-257.
- Van Wijk, K.J. 2001. Challenges and Prospects of Plant Proteomics. *Plant Physiology* 126: 501-508.
- Vander, P., Varum, K.M., Domard, A., Gueddari, N.E.E., Moerschbacher, B.M. 1998. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitoooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiology* 118: 1353-1359.
- VanEtten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., Farmer, E.E. 1994. Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *Plant Cell* 6:1191-1192.
- Vannini, A., Caruso, C., Leonardi, L., Rugini, E., Chiarot, C., Caporale, V., Buonocore, V. 1999. Antifungal properties of chitinases from *Castanea sativa* against hypovirulent and virulent strains of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 29-35.
- Vasconcelos, E.A.R., Nogueira, F.C.S., Abreu, E.F.M., Gonçalves, E.F., Souza, P.A.S., Campos, F.A.P. 2005. Protein extraction from cowpea tissues for 2-D gel electrophoresis and MS analysis. *Chromatographia* 62: 447-450.
- Vaultier, M.N., Cantrel, C., Vergnolle, C., Justin, A.M., Demandre, C., Benhassaine-Kesri, G., Cicek, D., Zachowski, A., Ruelland, E. 2006. Desaturase mutants reveal that membrane rigidification acts as a cold perception mechanism upstream of the diacylglycerol kinase pathway in *Arabidopsis* cells. *FEBS Letters* 580: 4218-4223.
- Velazhahan, R., Jayaraj, J., Liang, G.H., Muthukrishnan, S. 2003. Partial purification and N-terminal amino acid sequencing of a β -1,3-glucanase from sorghum leaves. *Biologia Plantarum* 46: 29-33.
- Velazhahan, R., Samiyappan, R., Vidhyasekaran, P. 2000. Purification of an elicitor-inducible antifungal chitinase from suspension-cultured rice cells. *Phytoparasitica* 28: 131-139.
- Vera, P., Conejero, V. 1988. Pathogenesis-related proteins of tomato. P-69 as an alkaline endoproteinase. *Plant Physiology* 87: 58-63.
- Verburg, J.G., Huynh, Q.H. 1991. Purification and characterization of an antifungal chitinase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 95: 450-455.
- Vergnolle, C., Vaultier, M.N., Taconnat, L., Renou, J.P., Kader, J.C., Zachowski, A., Ruelland, E. 2005. The cold-induced early activation of phospholipase C and D pathways determines the response of two distinct clusters of genes in *Arabidopsis* cell suspensions. *Plant Physiology* 139: 1217-1233.
- Verma, D.P.S., Gu, X. 1996. Vesicle dynamics during cell-plate formation in plants. *Trends in Plant Science* 1: 145-149.
- Veronese, P., Ruiz, M.T., Coca, M.A., Hernandez-Lopez, A., Lee, H., Ibeas, J.I., Damsz, B., Pardo, J.M., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Narasimhan, M.L. 2003. In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. *Plant Physiology* 131: 1580-1590.
- Vierling E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* 42: 579-620.
- Vierling, E., Kimpel, J.A., 1992. Plant responses to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* 3: 164-170.

- Vijayan, P., Browse, J. 2002. Photoinhibition in mutants of *Arabidopsis* deficient in thylakoid unsaturation. *Plant Physiology* 129: 876–885.
- Vinocur, B., Altman, A., 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 123–132.
- Vivier, E. Malissen, B. 2005. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nature Immunology* 6: 17 – 21.
- Vogeli-Lange, R., Frundt, C., Hart, C.M., Beffa, R., Nagy, F., Meins, F.J. 1994. Evidence for a role of beta-1,3-glucanase in dicot seed germination. *The Plant Journal* 5: 273–278.
- Vogelsang, R., Barz, W. 1993. Purification, characterization and differential hormonal regulation of a β -1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Planta* 189: 60–69.
- Vu, J.C.V., Niedz, R.P., Yelenosky, G. 1995. Activities of sucrose metabolism enzymes in glycerol-grown suspension cultures of sweet oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Environmental and Experimental Botany* 35: 455–463.
- Wade, N.L. 1981. Effects of storage atmosphere, temperature and calcium on low temperature injury of peach fruit. *Scientia Horticulturae* 15: 145–154.
- Walker, E.J., Ralston, G.B., Darvey, I.G. 1975. An allosteric model for ribonuclease. *Biochemical Journal* 147: 425–433.
- Walker, E.J., Ralston, G.B., Darvey, I.G. 1976. Further evidence for an allosteric model for ribonuclease. *Biochemical Journal* 153: 329–337.
- Walters, D., Meurer-Grimes, B., Rovira, I. 2001. Antifungal activity of three spermidine conjugates. *FEMS Microbiology Letters* 201: 255–258.
- Walters, D.R. 2003. Polyamines and plant disease. *Phytochemistry* 64: 97–107.
- Wang, C.Y. 1982. Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress. *HortScience* 17: 173–186.
- Wang, C.Y. 1989. Relation of chilling stress to ethylene production. En: *Low Temperature Stress Physiology in Crops*. Li, P.H. (ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida. pp: 177–189.
- Wang, C.Y., 1990a. *Chilling injury of horticultural crops*. Wang, C.Y (ed). CRC Press, Boca Ratón Florida.
- Wang, C.Y. 1990b. Physiological and biochemical effects of controlled atmosphere on fruit and vegetables. En: *Food preservation by modified atmospheres*. Calderon, M., Barkai-Golan, R. (eds), CRC Press, Florida. pp: 197–223.
- Wang, C.Y. 1993. Approaches to reduce chilling injury of fruits and vegetables. *Horticultural Reviews* 15: 63–95.
- Wang, C.Y. 1994. Combined treatment of heat shock and low temperature conditioning reduces chilling injury in zucchini squash. *Postharvest Biology and Technology* 4: 65–73.
- Wang, C.Y., 1995. Effect of temperature preconditioning on catalase, peroxidase and superoxide dismutase in chilled zucchini squash. *Postharvest Biology and Technology* 5: 67–76.
- Wang, C.Y. 2000. Postharvest techniques for reducing low temperature injury in chilling-sensitive commodities. En: *Improving Postharvest Technologies for Fruits, Vegetables and Ornamentals*. Artés, F., Gil, M.I., Conesa, M.A. (eds.), International Institute of Refrigeration, Eds. II. pp: 467–473.
- Wang, C.Y., Baker, J.E. 1979. Effects of 2 free-radical scavengers and intermittent warming on chilling injury and polar lipid composition of cucumber and sweet pepper fruits. *Plant and Cell Physiology* 145: 243–251.
- Wang, C.Y., Kramer, G.F., Whitaker, B.D., Lusby, W.R. 1992. Temperature preconditioning increases tolerance to chilling injury and alters lipid composition in zucchini squash. *Journal of plant physiology* 140: 229–235.
- Wang, C.Y., Qi, L. 1997. Modified atmosphere packaging alleviates chilling injury in cucumbers. *Postharvest Biology and Technology* 10: 195–200.
- Wang, S., Shao, B., Fu, H., Rao, P. 2009. Isolation of a thermostable legume chitinase and study on the antifungal activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 313–321.
- Wang, Y., Lu, W., Jiang, Y., Luo, Y., Jiang, W., Joyce, D. 2006. Expression of ethylene-related expansin genes in cool-stored ripening banana fruit. *Plant Science* 170: 962–967.
- Wang, Y., Chen, J.Y., Jiang, Y.M., Lu, W.J. 2007. Cloning and expression analysis of phenylalanine ammonia-lyase in relation to chilling tolerance in harvested banana fruit. *Postharvest Biology and Technology* 44: 34–41.

- Wang, Y.S., Tian, S.P., Xu, Y. 2005. Effects of high oxygen concentration on pro and anti-oxidant enzymes in peach fruits during postharvest periods. *Food Chemistry* 91: 99-104.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14.
- Wanner, L.A., Junttila, O. 1999. Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 120: 391-400.
- Ward, E.R., Payne, G.B., Moyer, M.B., Williams, S.C., Dincher, S.S., Sharkey, K.C., Beck, J.J., Taylor, H.T., Ahl-Goy, P., Meins, F.J., Ryals, J.A. 1991. Differential regulation of β -1,3-glucanase messenger RNAs in response to pathogen infection. *Plant Physiology* 96: 390-397.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Metraux, J.P., and Ryals, J.A. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 3: 1085-1092.
- Watanabe, N., Lam, E. 2006. The Hypersensitive response in plant disease resistance. En: *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants*. Tuzun, S., Bent, E. (eds.). Springer Science, New York, USA. pp: 83-111.
- Watanabe, T., Kanai, R., Kawase, T., Tanabe, T., Mitsutomi, M., Sakuda, S., Miyashita, K. 1999. Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. *Microbiology* 145: 3353-3363.
- Waterston, R., *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282: 2012-2018.
- Watkins, C.B. 2000. Responses of horticultural commodities to high carbon dioxide as related to modified atmosphere packaging. *Horttechnology* 10: 501-506.
- Watkins, C.B., Picton, S., Grierson, D. 1990. Stimulation and inhibition of expression of ripening related mRNAs in tomatoes as influenced by chilling temperatures. *Journal of Plant Physiology* 136: 318-323.
- Webb M.S., Uemura M., Steponkus, P.L. 1994. A comparison of freezing injury in oat and rye: two cereals at the extremes of freezing tolerance. *Plant Physiology* 104: 467-478.
- Webb, E.C., NC-ICBMB. 1992. *Enzyme Nomenclature 1992: Recommendations of the NCIUBMB on the Nomenclature and Classification of Enzymes*. Academic Press, San Diego, California. pp. 862
- Wei, Y., Zhang, Z., Andersen, C.H., Schmelzer, E., Gregersen, P.L., Collinge, D.B., Smedegaard-Petersen, V., Thordal-Christensen, H. 1998. An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Molecular Biology* 36: 101-112.
- Wemmer, T., Kaufmann, H., Kirch, H.H., Schneider, K., Lottspeich, F., Thompson, R.D. 1994. The most abundant soluble basic protein of the stylar transmitting tract in potato (*Solanum tuberosum* L.) is an endochitinase. *Planta* 194: 264-273.
- Wendehenne, D., Durner, J., Klessig, D.F. 2004. Nitric oxide: a new player in plant signaling and defense responses. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 449-455.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D.F., Durner, J. 2001. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animals and plant cells. *Trends in Plant Science* 6: 177-183.
- Wessels, J.G.H., Sietsma, J.H. 1981. Fungal cell walls: a survey. En: *Encyclopedia of Plant Physiology. Plant Carbohydrates II*. Tanner, W., Loewus, F.A. (eds.), vol 13B, Berlin, Springer Verlag. pp: 352-394.
- Williams, M.E., Torabinejad, J., Cohick, E., Parker, K., Drake, E.J., Thompson, J., Hortter, M., Dewald, D.B. 2005. Mutations in the *Arabidopsis* phosphoinositidephosphatase gene SAC9 lead to overaccumulation of PtdIns (4,5) P2 and constitutive expression of the stress-response pathway. *Plant Physiology* 138: 686-700.
- Wirth, S.J., Wolf, G.A. 1990. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. *Journal of Microbiological Methods* 12: 197-205.
- Wisniewski, M.E., Bassett, C., Arora, R. 2004. Distribution and partial characterization of seasonally expressed proteins in different aged shoots and roots of 'Loring' Peach (*Prunus persica*). *Tree Physiology* 24: 339-345.
- Wisniewski, M.E., Bassett, C.L., Artlip, T.S., Webb, R.P., Janisiewicz, W.J., Norelli, J.L., Goldway, M., Droby, S. 2003. Characterization of a defensin in bark and fruit tissues of peach and antimicrobial activity of a recombinant defensin in the yeast, *Pichia pastoris*. *Physiologia Plantarum* 119: 563-572.

- Wisniewski, M.E., Bassett, C.L., Renaut, J., Farrell, R.J., Tworowski, T., Artlip, T.S. 2006. Differential regulation of two dehydrin genes from peach (*Prunus persica*) by photoperiod, low temperature and water deficit. *Tree Physiology* 26: 575-584.
- Wisniewski, M.E., Webb, R., Balsamo, R., Close, T.J., Yu, X.M., Griffith, M., 1999. Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: a dehydrin from peach (*Prunus persica*). *Physiologia Plantarum* 105: 600-608.
- Wong, Y.S., MacLachlan, G.A. 1980. 1,3- β -D-Glucanases from *Pisum sativum* seedlings III. Development and distribution of endogenous substrates. *Plant Physiology* 65: 222-228.
- Woolf, A.B., Watkins, C.B., Bowen, J.H., Lay-Yee, M., Maindonald, J.H., Ferguson, I.B. 1995. Reducing external chilling injury in stored 'Hass' avocados with dry heat treatments. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120: 1050-1056.
- Worrall D., Hird, D.L., Hodge, R., Paul, W., Draper, J., Scott, R. 1992. Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *The Plant Cell*, 4: 759-771.
- Wu, J., Lightner, J., Warwick, N., Browse, J. 1997. Low-temperature damage and subsequent recovery of *fab1* mutant *Arabidopsis* exposed to 2 °C. *Plant Physiology* 113: 347-356.
- Wu, C.T., Leubner-Metzger, G., Meins, F.J. Bradford, K.J. 2001. Class I β -1,3-glucanase and chitinase are expressed in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. *Plant Physiology* 126: 1299-1313.
- Wu, H., Echt, C.S., Popp, M.P., Davis, J.M. 1997. Molecular cloning, structure and expression of an elicitor-inducible chitinase gene from pine trees. *Plant Molecular Biology* 33: 979-987.
- Wu, S., Kriz, A., Widholm, J. 1994. Molecular analysis of two cDNA clones encoding acidic class 1 chitinase in maize. *Plant Physiology* 105: 1097-1105.
- Wubben, J.P., Joosten, M.H.A., van Kan, J.A.L., de Wit, P.J.G.M. 1992. Subcellular localization of plant chitinase and 1,3- β -glucanases in *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*)-infected tomato leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41: 23-32.
- Wurms, K., Long, P., Greenwood, D., Sharrock, K., Ganesh, S. 1997. Endo- and exochitinase activity in kiwifruit infected with *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* 145: 145-151.
- Wyn Jones, R.G., Storey, R. 1981. Betaines. En: *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. Paleg, L. G., Aspinall, D. (eds.), Academic Press, New York. pp: 171-204.
- Wyss, D.F., Choi, J.S., Knoppers, M.H., Willis, K.J., Arulanandam, A.R., Smolyar, A., Reinherz, E.L., Wagner, G. 1995. Conformation and function of the N-linked glycan in the adhesion domain of human CD2. *Science* 269: 1273-1278.
- Xiao, H., Nassuth, A. 2006. Stress- and development-induced expression of spliced and unspliced transcripts from two highly similar dehydrin 1 genes in *V. riparia* and *V. vinifera*. *Plant Cell Reports* 25: 968-977.
- Xie, Z.P., Staehelin, C., Wiemken, A., Broughton, W.J., Müller, J., Boller, T. 1999. Symbiosis-stimulated chitinase isoenzymes of soybean (*Glycine max* (L.) Merr). *Journal of Experimental Botany* 50: 327-333.
- Xin, Z., Browse, J. 1998. *Eskimo1* mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 7799-7804.
- Xing, W., Rajashekar, C.B. 2001. Glycine betaine involvement in freezing tolerance and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany* 46: 21-28.
- Xing, W., Rajashekar, C.B. 1997. Cold acclimation-induced pathogenesis-related proteins and glycine betaine involvement in cold tolerance of *Arabidopsis thaliana* and barley. Environmental Response & Adaptation, session 45, *Plant Biology*, Vancouver, Canada.
- Xing, W., Rajashekar, C.B., 1999. Alleviations of water stress in beans by exogenous glycine betaine. *Plant Science* 148: 185-195.
- Xiong, L., Lee, B.H., Ishitani, M., Lee, H., Zhang, C. and Zhu, J.K. 2001. FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 15: 1971-1984.

- Xu, Q., Ma, P., Yu, W., Tan, C., Liu, H., Xiong, C., Qiao, Y., Du, Y. 2009. Chitoooligosaccharides protect human embryonic hepatocytes against oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Marine Biotechnology* 12: 292-298.
- Xu, X.Y., Bewley, J.D., Greenwood, J.S. 2000. Cloning and characterization of an 18 kiloDalton protein in the roots of the perennial weed *Taraxacum officinale* Weber (Dandelion) which has allergen- and pathogenesis-related protein properties. *Plant, Cell and Environment* 23: 1227-1236
- Xu, P., Harvey, A.J., Fincher, G.B. 1994. Heterologous expression of cDNAs encoding barley (*Hordeum vulgare*) (1-->3)-beta-glucanase isoenzyme GV. *FEBS Letters* 348: 206-210.
- Yaish, M.W., Doxe, A.C., McConkey, B.J., Moffatt, B.A., Griffith, M. 2006. Cold-active winter rye glucanases with ice-binding capacity. *Plant Physiology* 141: 1459-1472.
- Yamada, A., Naoto, S., Osamu, K., Tadami, A. 1993. Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitoooligosaccharides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 57: 405-409.
- Yamada, T., Kuroda, K., Jitsuyama, Y., Takezawa, D., Arakawa, K., Fujikawa, S. 2002. Roles of the plasma membrane and the cell wall in the responses of plant cells to freezing. *Planta* 215: 770-778.
- Yamagami, T., Funatsu, G. 1996. Limited proteolysis and reduction-carboxymethylation of rye seed chitinase-a: Role of the chitin-binding domain in its chitinase action. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 60: 1081-1086.
- Yamagami, T., Mine, Y., Aso, Y., Ishiguro, M. 1997. Purification and characterization of two chitinase isoforms from the bulbs of gladiolus (*Gladiolus gandavensis*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 61: 2140-2142.
- Yamaki, S., Uritani, I. 1972. Mechanism of chilling injury in sweet potato: VII. Changes in mitochondrial structure during chilling storage. *Plant and Cell Physiology* 13: 795-799.
- Yan, S.P., Zhang, Q.Y., Tang, Z.C., Su, W.A., Sun, W.N. 2006. Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Molecular and Cell Proteomics* 5: 484-496.
- Yancey, P.H. 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology* 208: 2819-2830.
- Yeh, S., Moffatt, B.A., Griffith, M., Xiong, F., Yang, D.S.C., Wiseman, S.B., Sarhan, F., Danyluk, J., Xue, Y.Q., Hew, C.L., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G. 2000. Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals. *Plant Physiology* 124: 1251-1263.
- Yi, C. 1981. Increase in beta-N-acetylglucosaminidase activity during germination of cotton seeds. *Plant Physiology* 67: 68-73
- Yokoyama, R., Nishitani, K. 2004. Genomic basis for cell-wall diversity in plants. A comparative approach to gene families in rice and *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 45: 1111-1121.
- Yu, Y., Kang, Z., Buchenauer, H., Huang, L. 2009. Purification and characterization of a novel extracellular β -1,3-glucanase complex (GluGgt) secreted by *Gaeumannomyces graminis* var. tritici. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 2147-2155.
- Yoshida, S., Hotsubo, K., Kawamura, Y., Murai, M., Arakawa, K., Takezawa, D. 1999. Alterations of intracellular pH in response to low temperature stresses. *Journal of Plant Research* 112: 225-236.
- Yoshikawa, M., Yamaoka, N., Takeuchi, Y. 1993. Elicitors: their significance and primary modes of action in the induction of plant defense reactions. *Plant and Cell Physiology* 34: 1163-1173.
- Yoshioka, K., Nakashita, H., Klessig, D.F., Yamaguchi, I. 2001. Probenazole induces systemic acquired resistance in *Arabidopsis* with a novel type of action. *The Plant Journal* 25: 149-157.
- Young, V.L., Simpson, R.M., Ward V.K. 2005. Characterization of an exochitinase from *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus (family Baculoviridae). *Journal of General Virology* 86: 3253-3261.
- Yu, X., Griffith, M. 2001. Winter rye antifreeze activity increases in response to cold and drought, but not abscisic acid. *Physiologia Plantarum* 112: 78-86.
- Yu, X., Griffith, M., Wiseman, S.B. 2001. Ethylene induces antifreeze activity in winter rye leaves. *Plant Physiology* 126: 1232-1240.
- Yuen, C.M.C., Tridjaja, N.O., Wills, R.B.H., Wild, B.L. 1995. Chilling injury development of 'Tahitian' lime, 'Emperor' mandarin, 'Marsh' grapefruit and 'Valencia' orange. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 67: 335-339.

- Yun, D., D'Urzo, M.P., Abad, L., Takeda, S., Salzman, R., Chen, Z., Lee, H., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. 1996a. Novel osmotically induced antifungal chitinases and bacterial expression of an active recombinant isoform. *Plant Physiology* 111: 1219-1225.
- Yun, J.G., Hayashi, T., Yazawa S., Katoh T., Yasuda Y. 1996b. Acute morphological changes of palisade cells of *Saintpaulia* leaves induced by a rapid temperature drop. *Journal of Plant Research* 109: 339-342.
- Zacarias, L., Lafuente, M.T., Marcos, J.F., Saladie, M., Dupille, E. 2003. Regulation of ethylene biosynthesis during cold storage of the chilling-sensitive Fortune mandarin fruit. En: *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene*. Vendrell, M., Klee, H., Pech, J.C., Romojaro, F. (eds.), IOS Press, Amsterdam. pp: 112-117.
- Zacharius, R.M., Zell, T.E., Morrison, J.H., Woodlock, J.J. 1969. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 30: 148-152.
- Zeevart, J.A.D., Creelman, R.A. 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39: 439-473.
- Zeffren, E., Hall, P.L. 1973. *The Study of Enzyme Mechanisms*. John Wiley & Sons Interscience (eds.), New York, USA. pp. 167.
- Zhang, D., Hrmova, M., Wan, C.H., Wu, C., Balzen, J., Cai, W., Wang, J., Densmore, L.D., Fincher, G.B., Zhang, H., Candace, H. 2004a. Members of a new group of chitinase-like genes are expressed preferentially in cotton cells with secondary walls. *Plant Molecular Biology* 54: 353-372.
- Zhang, D.Q., Liu, B., Feng, D.R., He, Y.M., Wang, S.Q., Wang, H.B., Wang, J.F. 2004b. Significance of conservative asparagine residues in the thermal hysteresis activity of carrot antifreeze protein. *Biochemical Journal* 377: 589-595.
- Zhang, J.H., Huang, W.D., Liu, Y.P., Pan, Q.H. 2005. Effects of temperature acclimation pre-treatment on the ultrastructure of mesophyll cells in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Jingxiu) under cross-temperature stresses. *Journal of Integrative Plant Biology* 47: 959-970.
- Zhang, S., Du, H., Klessig, D.F. 1998. Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *The Plant Cell* 10: 435-450.
- Zhang, S., Klessig, D.F. 2001. MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science* 11: 520-527.
- Zhang, S., Wolfgang, D.E., Wilson, D.B. 1999. Substrate heterogeneity causes the nonlinear kinetics of insoluble cellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 66: 35-41.
- Zhang, Z., Collinge, D.B., Thordal-Christensen, H. 1995. Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *The Plant Journal* 8: 139-145.
- Zhao, K.J., Chye, E.A. 1999. Methyl jasmonate induces expression of a novel *Brassica juncea* chitinase with two chitin-binding domains. *Plant Molecular Biology* 40: 1009-1018.
- Zheng, Y., Fung, R.W., Wang, S.Y., Wang, C.Y. 2008. Transcript levels of antioxidative genes and oxygen radical scavenging enzyme activities in chilled zucchini squash in response to superatmospheric oxygen. *Postharvest Biology and Technology* 47: 151-158.
- Zhou, H.W., Ben-Arie, R., Lurie, S. 2000. Pectin esterase, polygalacturonase and gel formation in peach pectin fractions. *Phytochemistry* 55: 191-195.
- Zhou, J., Tang, X., Martin, G.B. 1997. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. *The EMBO Journal* 16: 3207-3218.
- Zhu, J., Dong, C.H., Zhu, J.K. 2007. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 290-295.
- Zhu, Q., Dröge-Laser, W., Dixon, R.A., Lamb, C. 1996. Transcriptional activation of plant defense genes. *Current Opinion in Genetic and Development* 6: 624-630.
- Zhu, Q., Maher, E.A., Masoud, S., Dixon, R.A., Lamb, C.J. 1994. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Nature Biotechnology* 12: 807-811.
- Zimmer, C., Platz, T., Cadez, N., Giffhorn, F., Kohring, G.W. 2006. A cold active (2R,3R)-(-)-di-O-benzoyl-tartrate hydrolyzing esterase from *Rhodotorula mucilaginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73: 132-140.

Zipfel C., Felix, G. 2005. Plants and animals: a different taste for microbes? *Current Opinion in Plant Biology* 2005, 8: 353-360.

ANEXOS

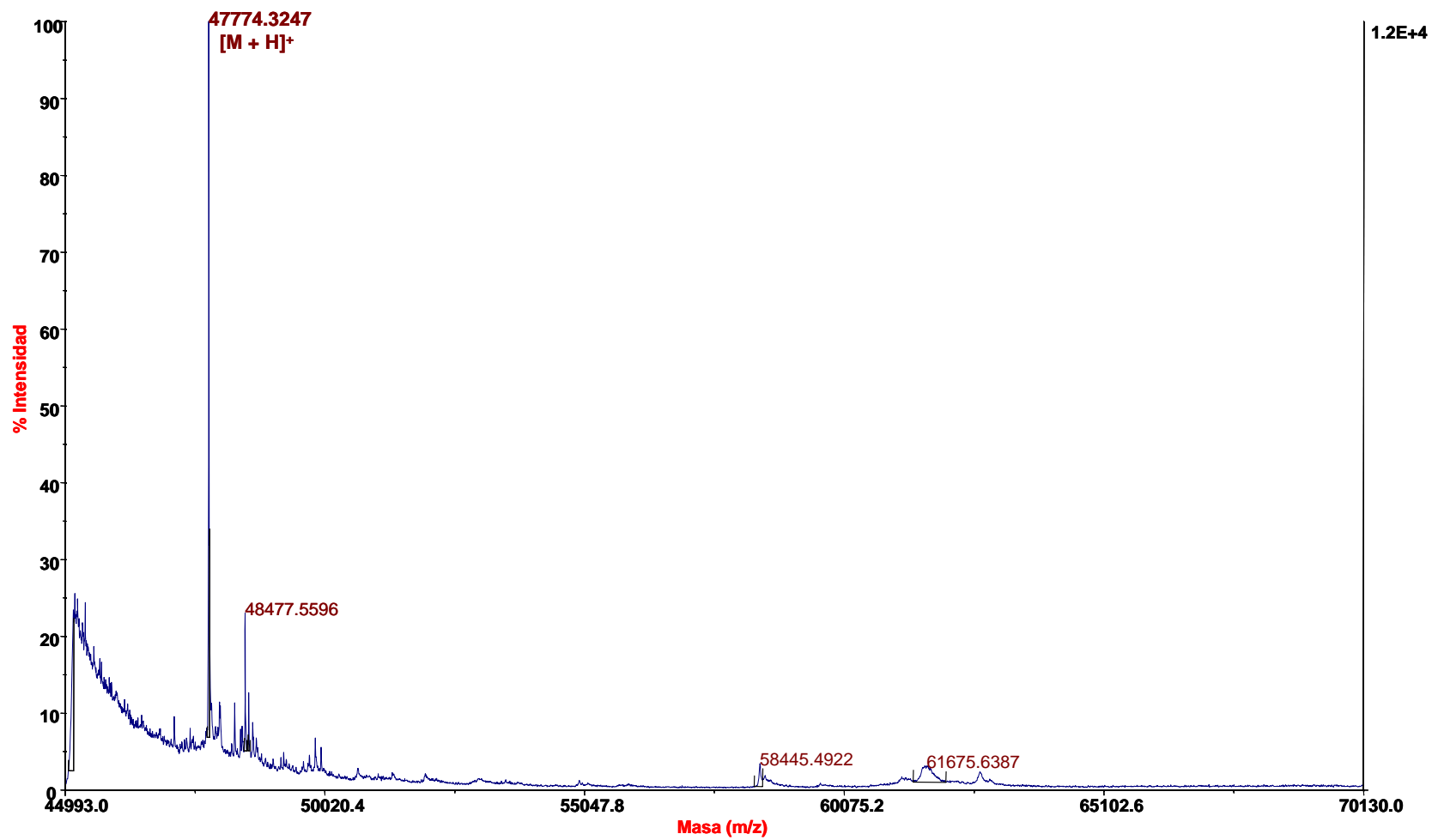


ANEXO I

Espectros de masas obtenidas mediante MALDI-TOF para la determinación de la masa molecular de las diferentes isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas del mesocarpo de chirimoya. Las huellas peptídicas han sido obtenidas mediante un espectrómetro de masas Voyager DE-STR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems, EE.UU.) trabajando en modo reflectrón positivo y elaboradas con el programa informático Voyager 2 GHz Acquisition System (Applied Biosystems, EE.UU.). El eje de abscisas y de ordenadas de los espectros muestra la relación masa/carga (m/z) y la abundancia relativa (%) de los fragmentos peptídicos, respectivamente. En los espectros se indica la carga de la proteína con la notación $[M + nH]^{n+}$.

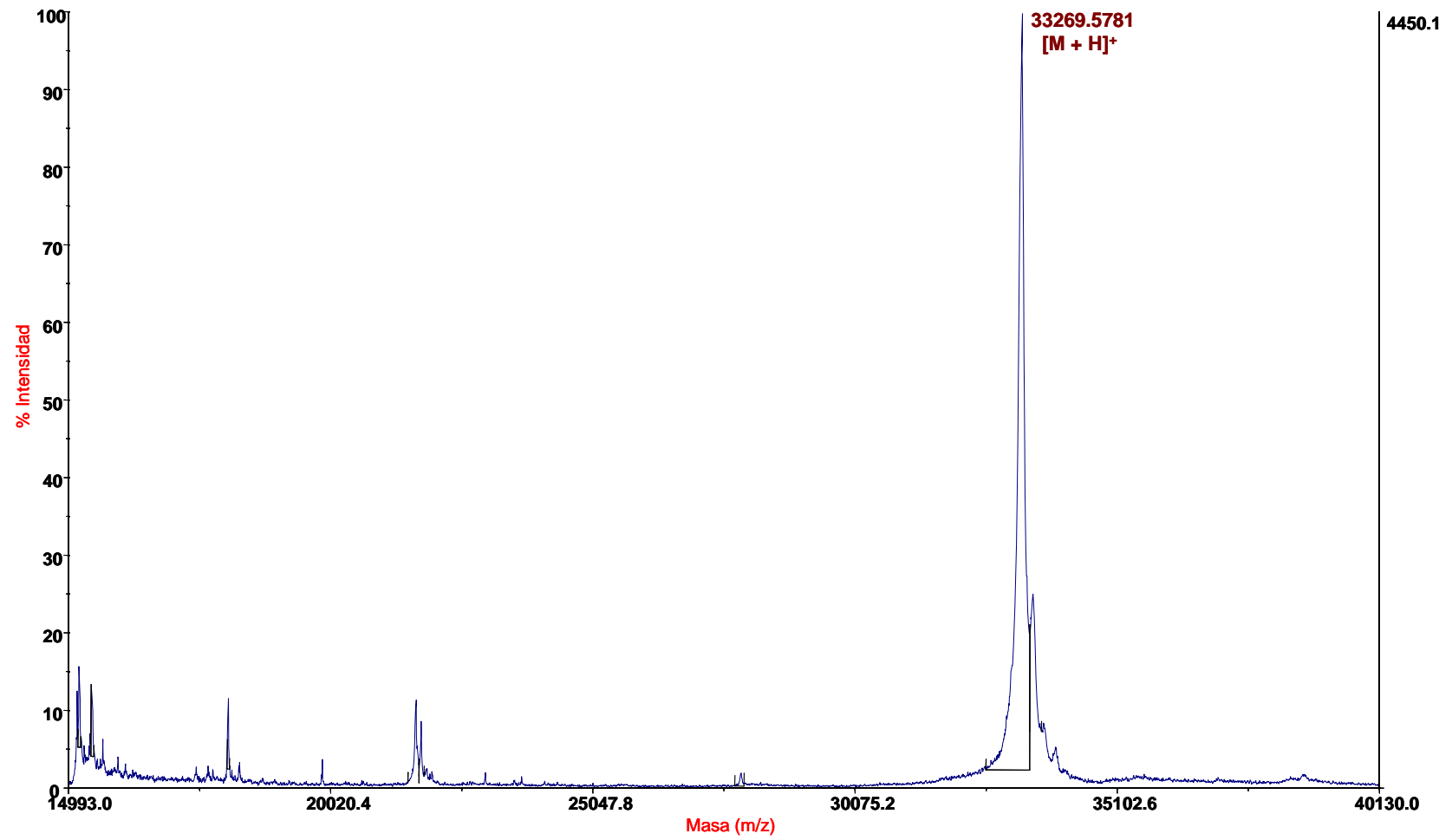
Espectro de masas AChi48

4800 Linear Spec #1 MC=>SM5[BP = 47774.3, 12059]



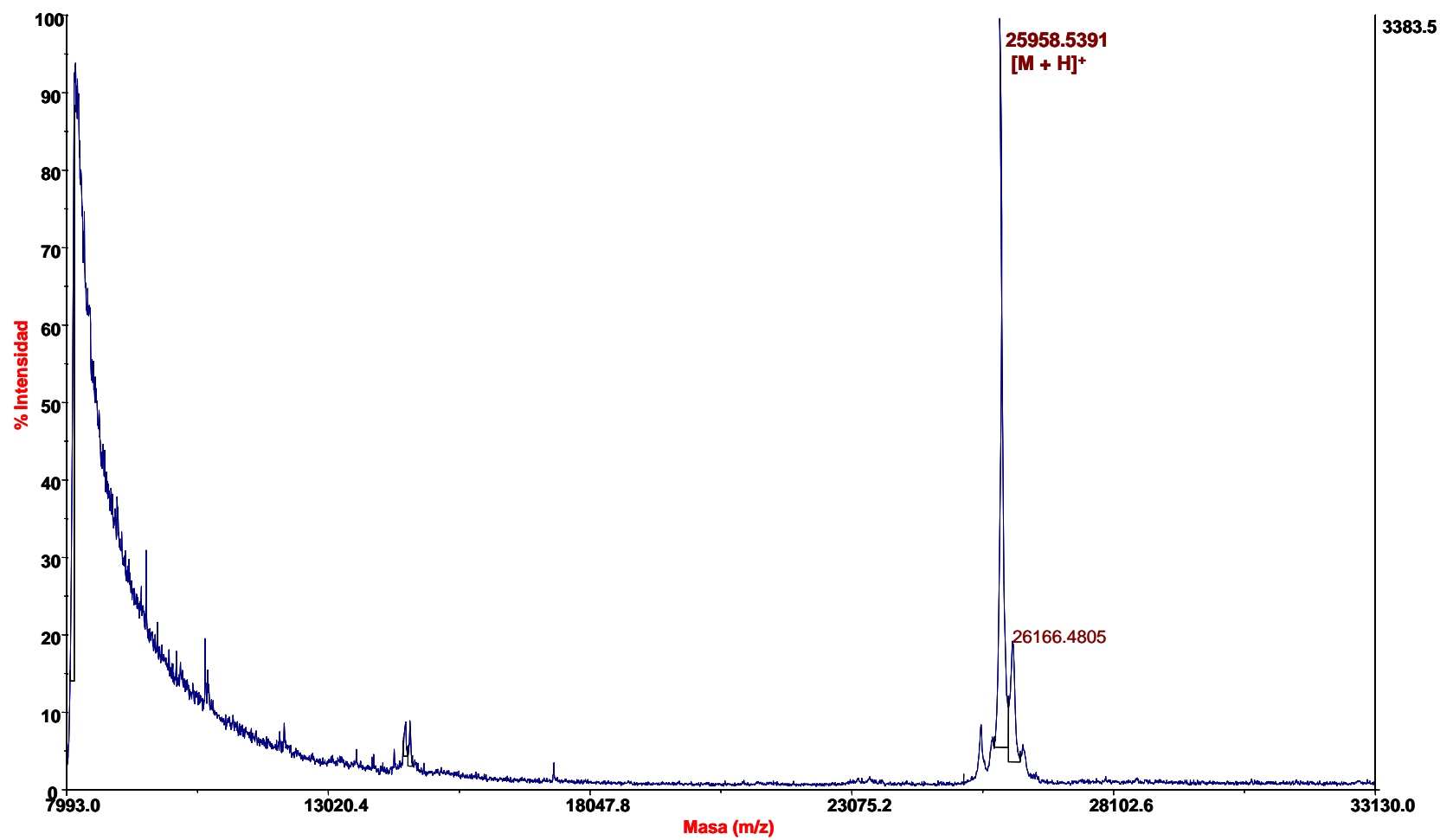
Espectro de masas BChi33

4800 Linear Spec #1 MC=>SM5[BP = 33269.6, 4450]



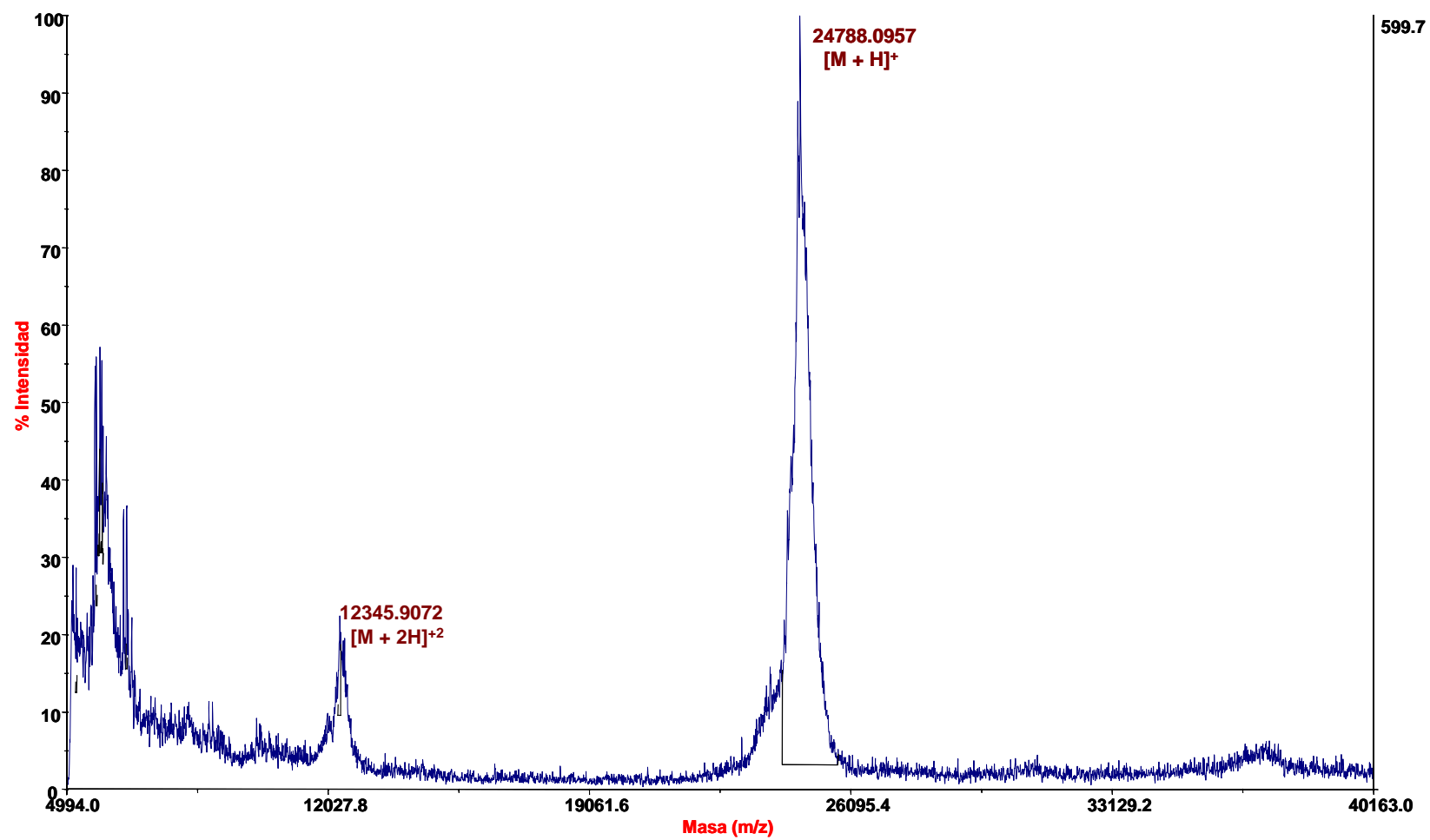
Espectro de masas AChi26

4800 Linear Spec #1 MC=>SM5[BP = 25958.5, 3384]



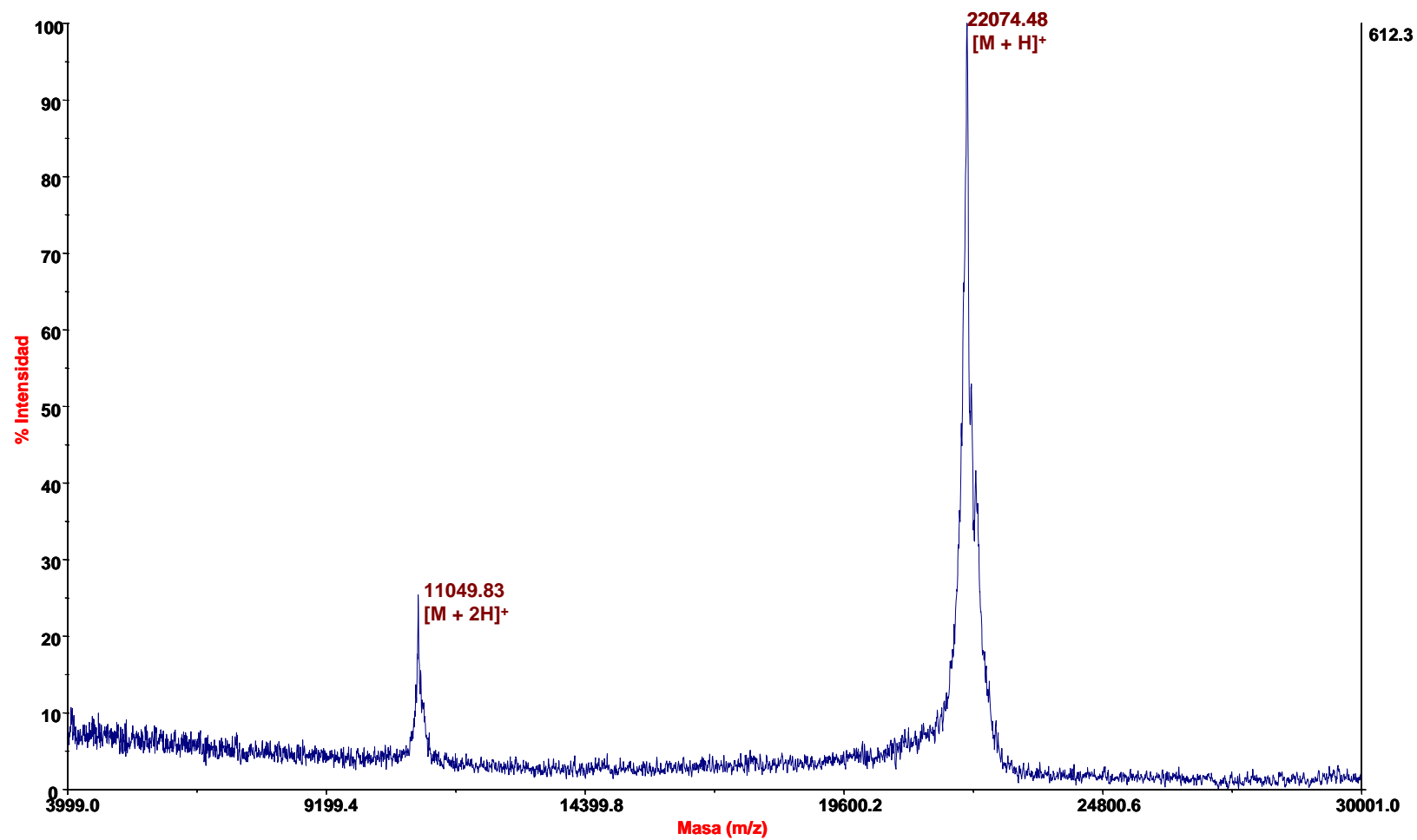
Espectro de masas AChi24

4800 Linear Spec #1 MC=>SM5[BP = 24788.1, 600]



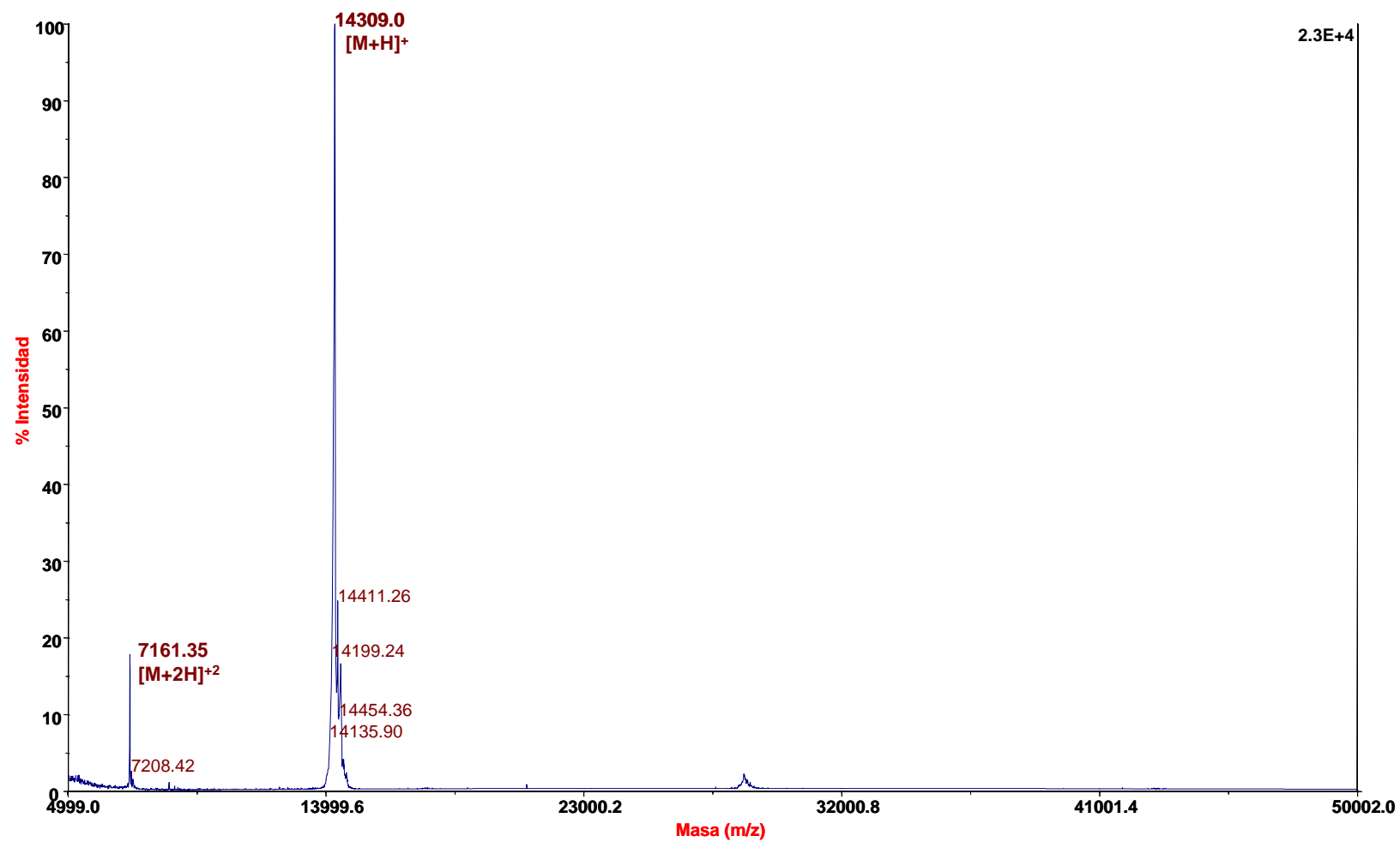
Espectro de masas AGlu19

Voyager Spec #1=>BC=>SM11[BP = 22074.5, 612]



Espectro de masas BChi14

Voyager Spec #1=>BC=>NF0.7[BP = 14309.0, 22857]



ANEXO II

Huellas peptídicas obtenidas mediante EM para las diferentes isoenzimas quitinasa y 1,3- β -glucanasa purificadas del mesocarpo de chirimoyas. Las huellas peptídicas han sido obtenidas mediante MALDI-TOF y elaboradas con el programa informático 4000 Series Explorer 3.0. El eje de abscisas y de ordenadas de los espectros muestra la relación masa/carga (m/z) y la abundancia relativa (%) de los fragmentos peptídicos, respectivamente. En aquellas proteínas identificadas se incluye información relativa al número de acceso en la base de datos NCBI y secuencia de aminoácidos (formato FASTA). Las secuencias de aminoácidos en **negrita** muestran la cobertura de los péptidos identificados con la secuencia en la base de datos.

También se incluyen los espectros de fragmentación de los péptidos obtenidos de algunas de las isoenzimas quitinasa con la aplicación de un análisis MALDI-TOF/TOF e información relativa a su secuencia. Estos péptidos se muestran en color **rojo** en el espectro de la huella peptídica de la proteína correspondiente. Para las isoenzimas identificadas mediante PMF o PMF + EM/EM se indica tanto la posición de los péptidos identificados como sus características. En el caso de aquellos espectros que no dieron ninguna identificación positiva mediante la búsqueda en la base de datos NCBI con el programa informático MASCOT 1.9, se incorpora la elucidación de la secuencia del péptido mediante la aplicación DeNovo Explorer. La adición de un asterisco (*) después del símbolo de la metionina (M) indica la oxidación de este residuo.

Durante el análisis EM/EM, los péptidos pueden fragmentarse por cualquiera de los enlaces de su cadena lineal, generando fragmentos de diferentes tipos (Fig.88). Las series de fragmentos de tipo **a**, **b** y **c** contienen el extremo N-terminal mientras que las de tipo **x**, **y** y **z** contienen el C-terminal. Para nombrar los distintos fragmentos se utilizan los símbolos anteriores con un subíndice, que indica el número de aminoácidos que contienen. Las masas que contienen anotaciones en minúscula (y, a, b, etc.) revelan el tipo de ion generado en la fragmentación de los repertorios peptídicos. Por último, los fragmentos iónicos derivados de la rotura de dos enlaces se indican con la letra o serie de letras que identifican su secuencia aminoacídica (p.ej: iones imonio).

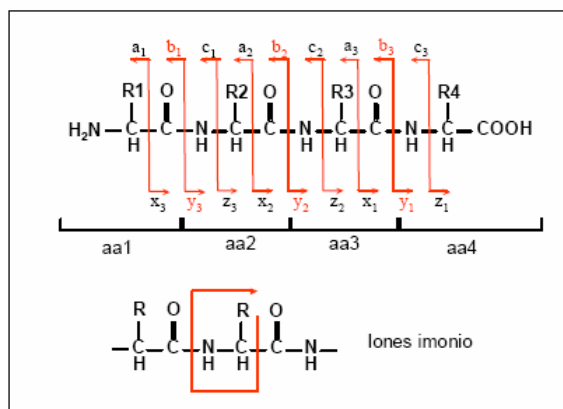
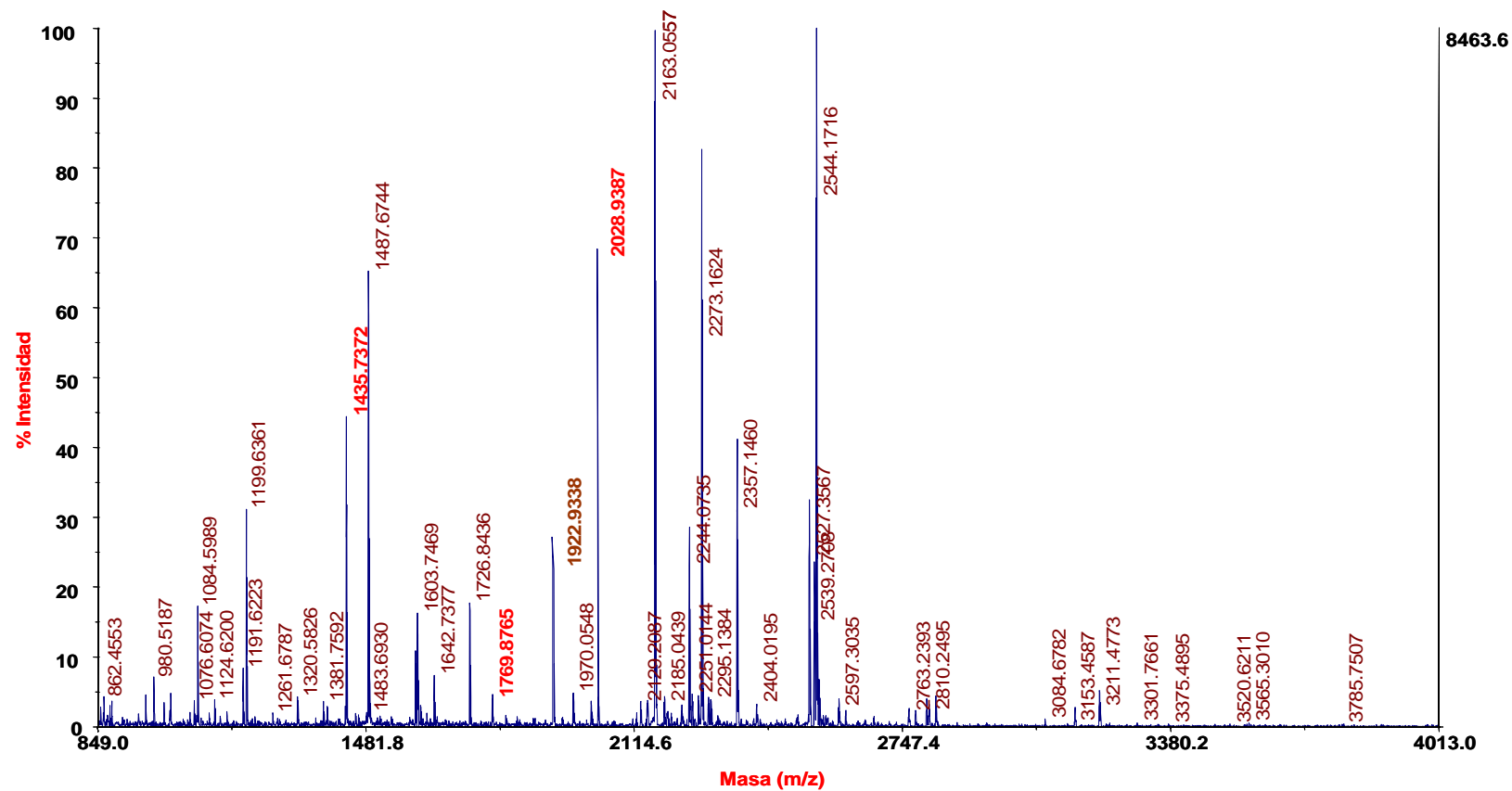
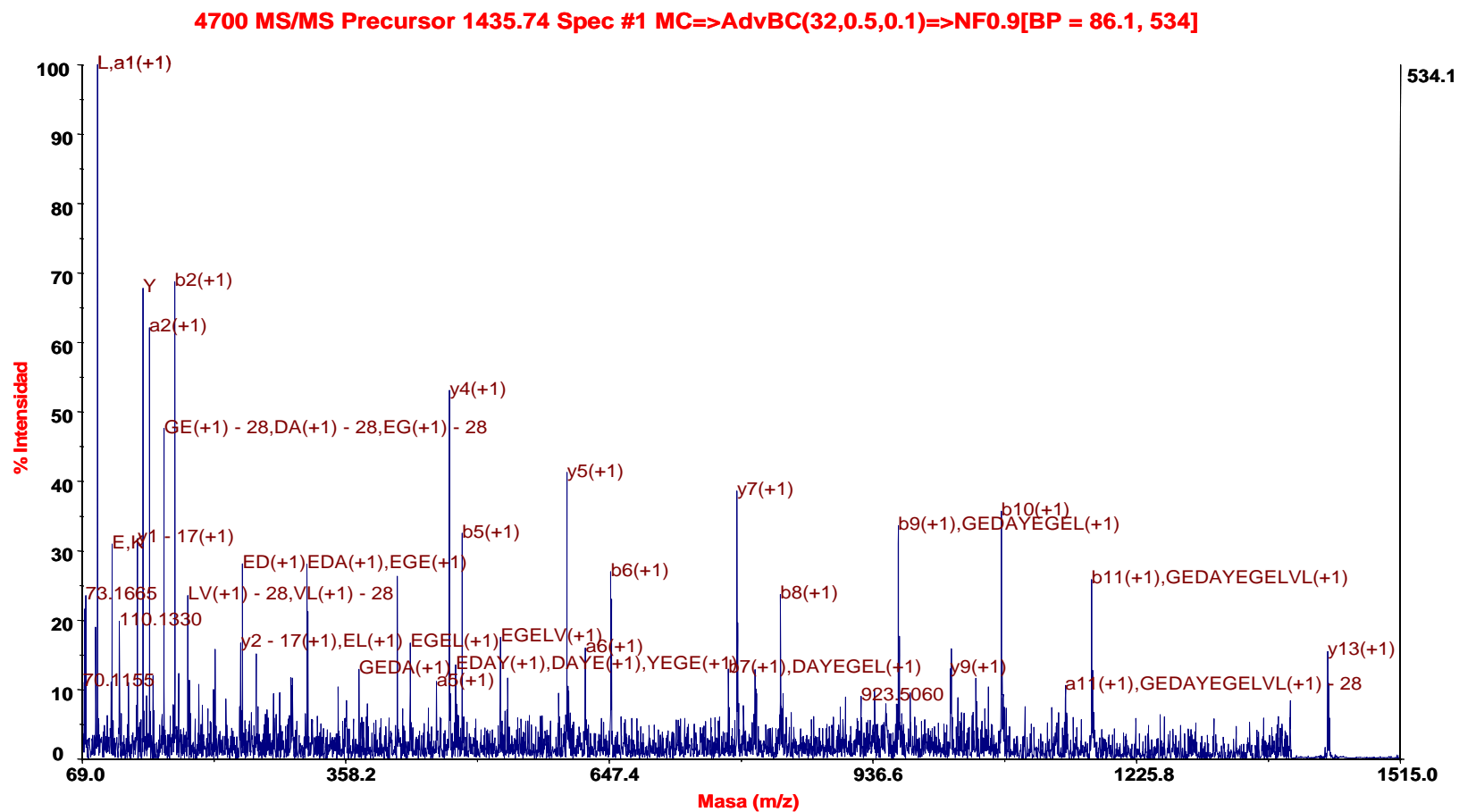


Figura 88.- Esquema de fragmentación de péptidos mediante EM/EM.

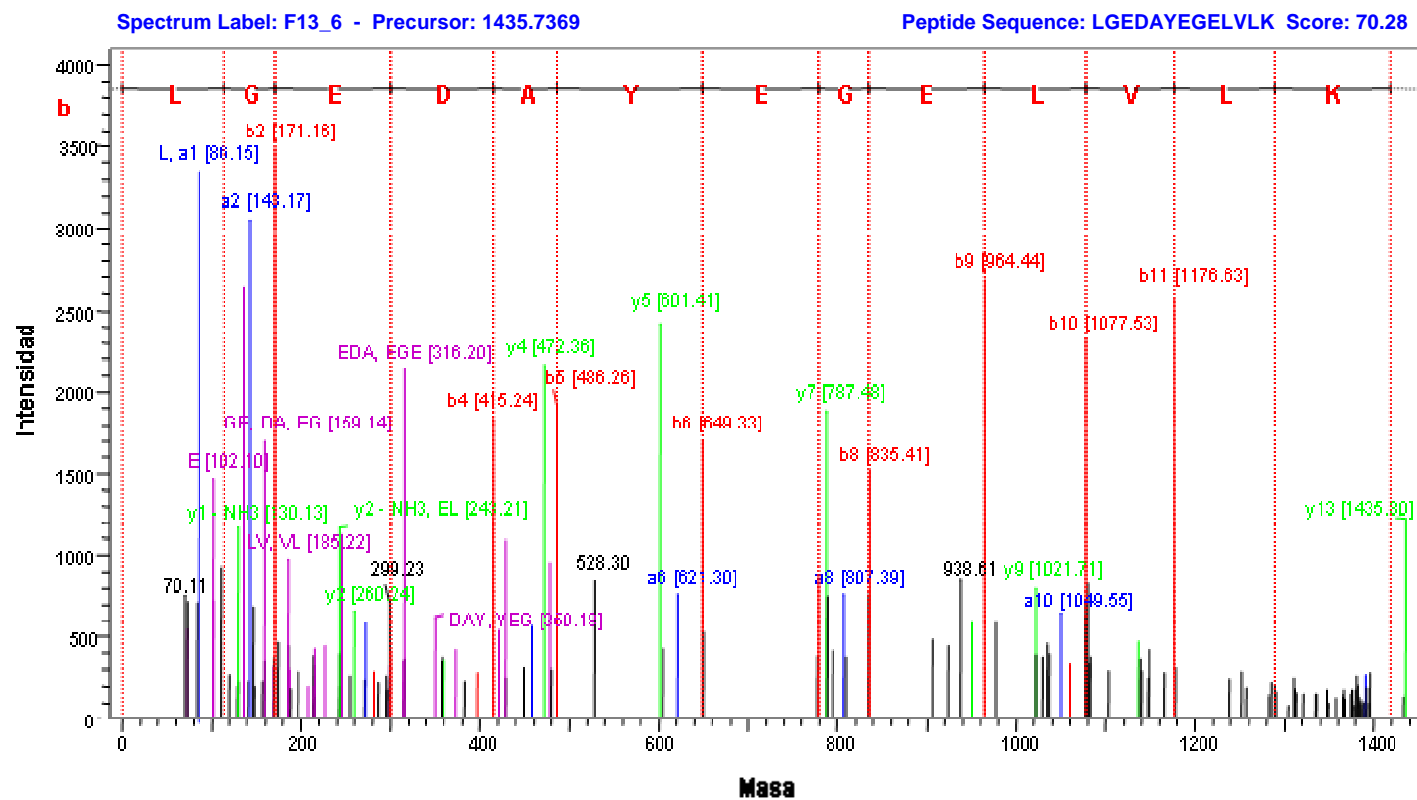
Huella peptídica AChi48

4700 Reflector Spec #1 MC=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>NF0.9[BP = 2545.2, 8464]



Espectro EM/EM ion m/z 1435,74 (AChi48)

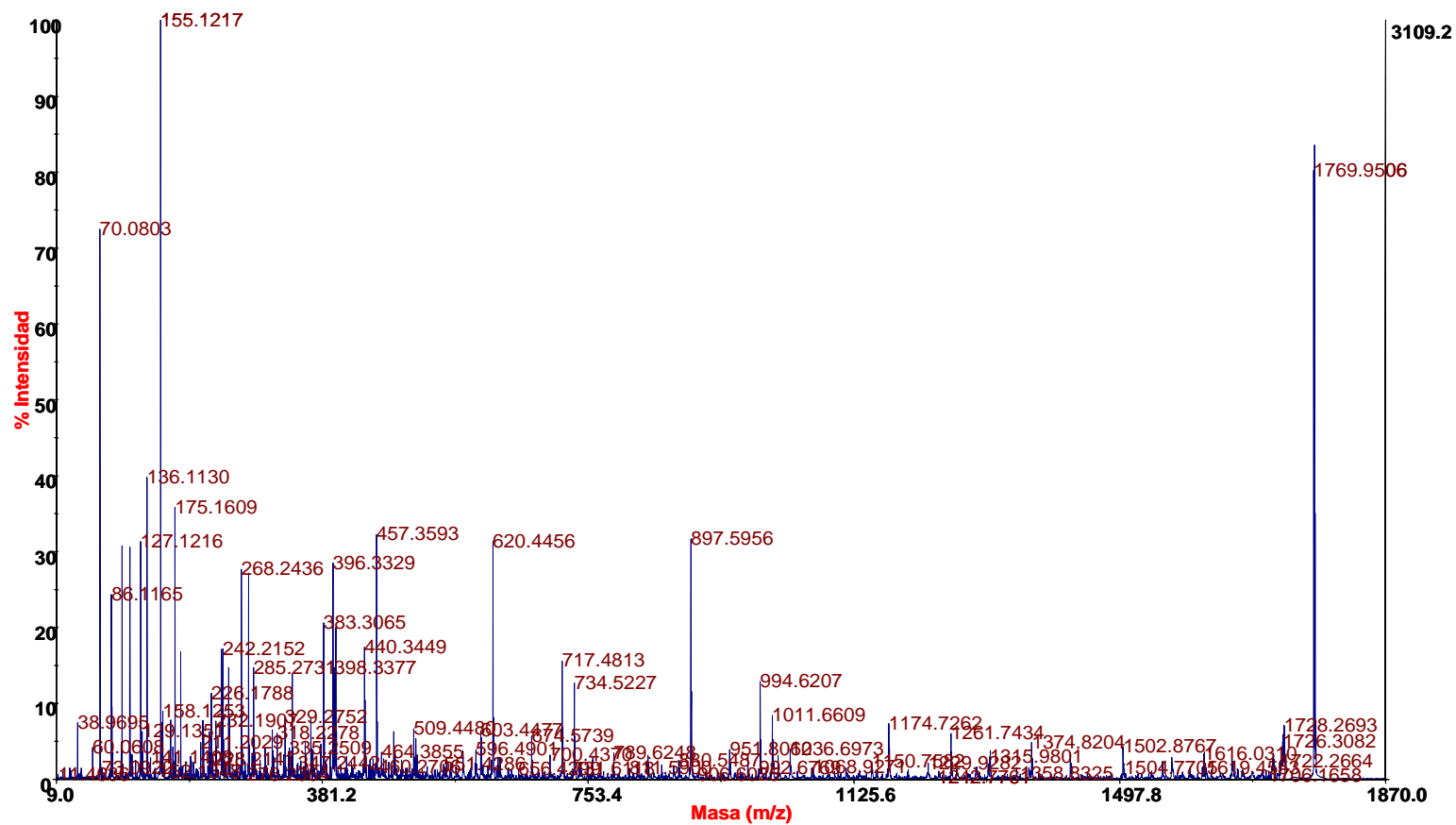
Analisis *de novo* ion m/z 1435,74 (AChi48)



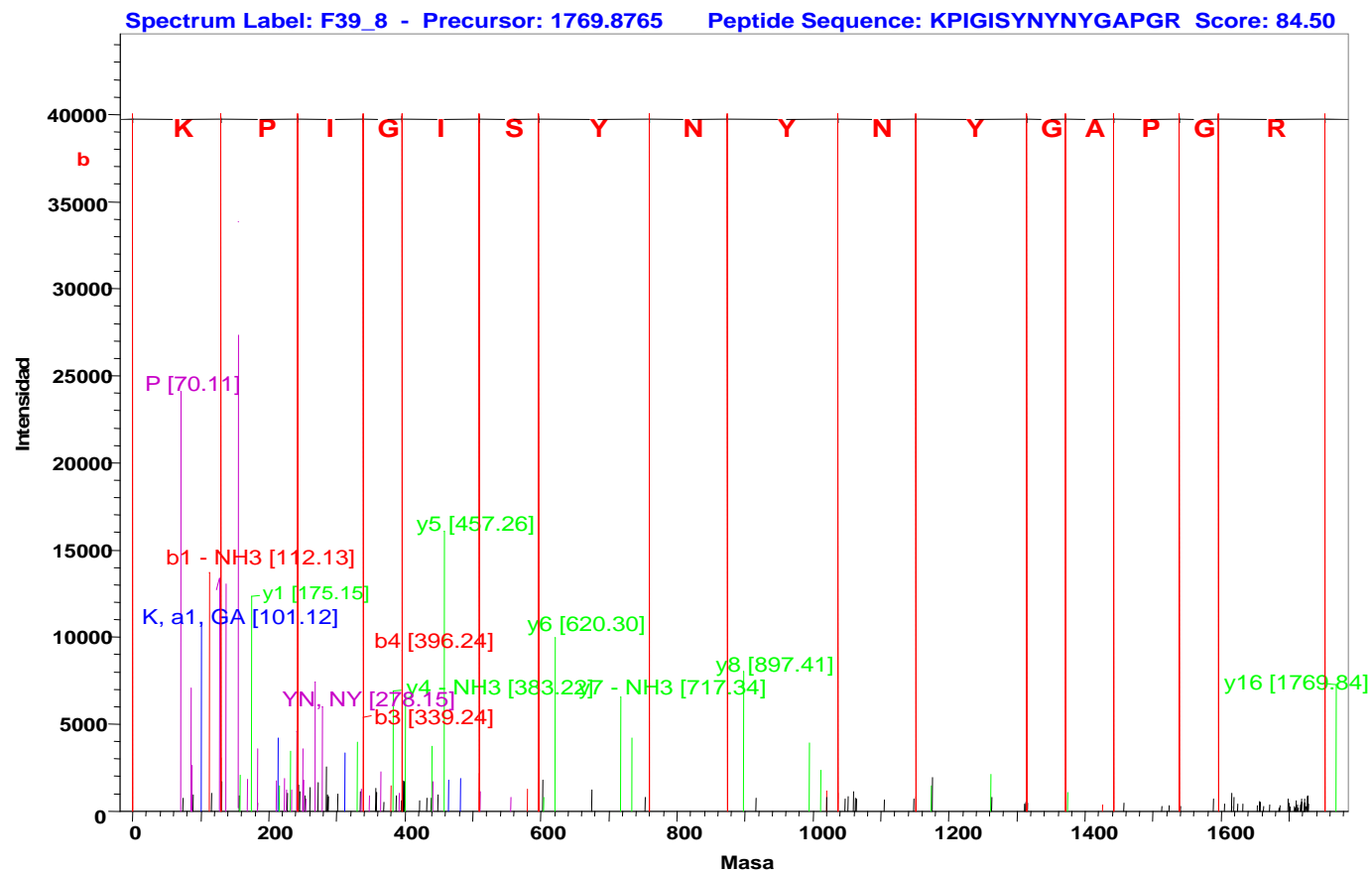
Secuencia péptido m/z 1435,73 = **LGEDAYEGELVLK** (*score*: 70,28)

Espectro EM/EM ion m/z 1769,87 (ACh48)

4700 MS/MS Precursor 1769.87 Spec #1 MC=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>NF0.9[BP = 155.1, 3109]



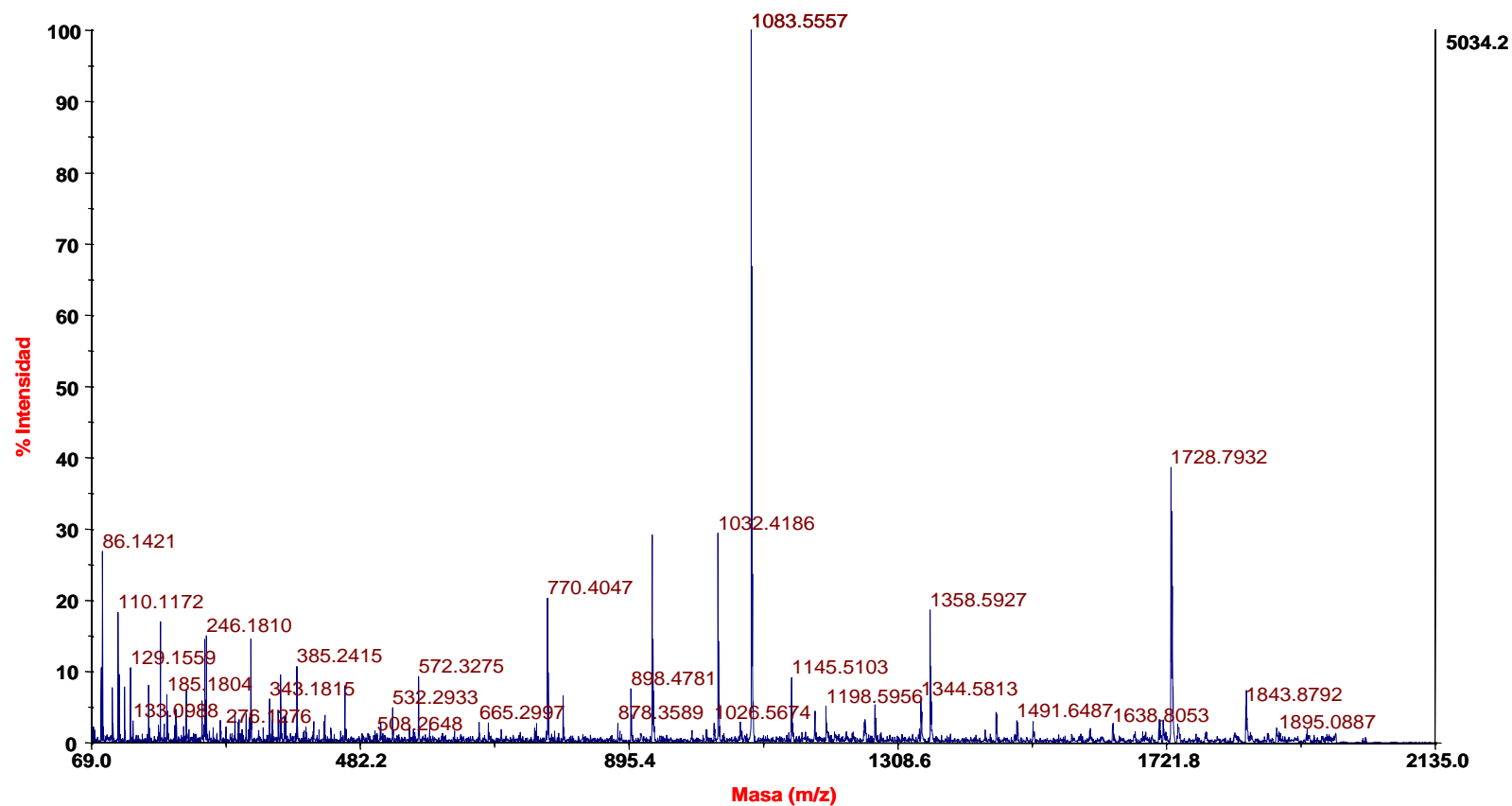
Analisis *de novo* ion m/z 1769,87 (AChi48)



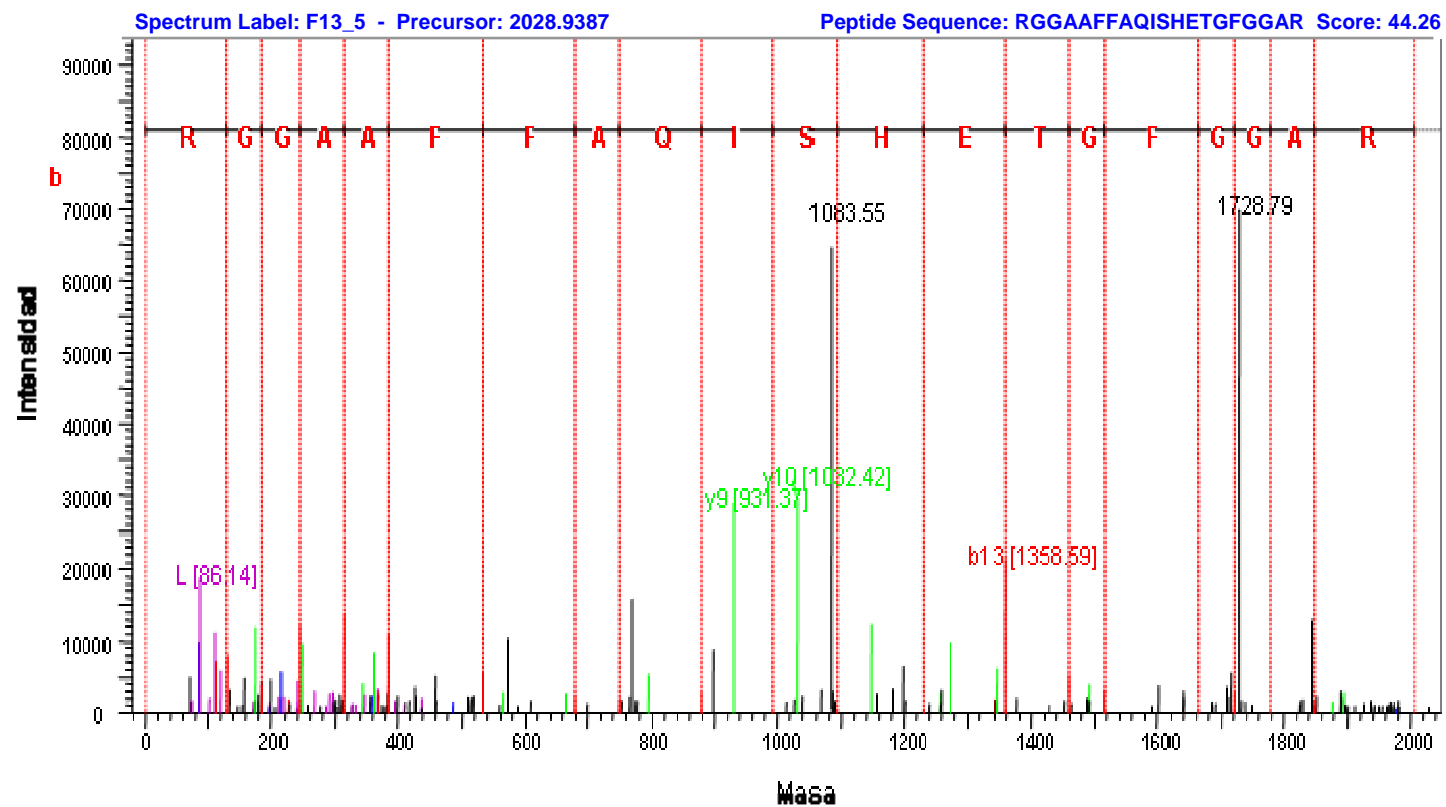
Secuencia péptido m/z 1769,87 = **KPIGISYNNYNYGAPGR** (*score*: 84,50)

Espectro EM/EM ion m/z 2028.93 (AChi48)

4700 MS/MS Precursor 2028.93 Spec #1 MC=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>NF0.9[BP = 1083.5, 5034]



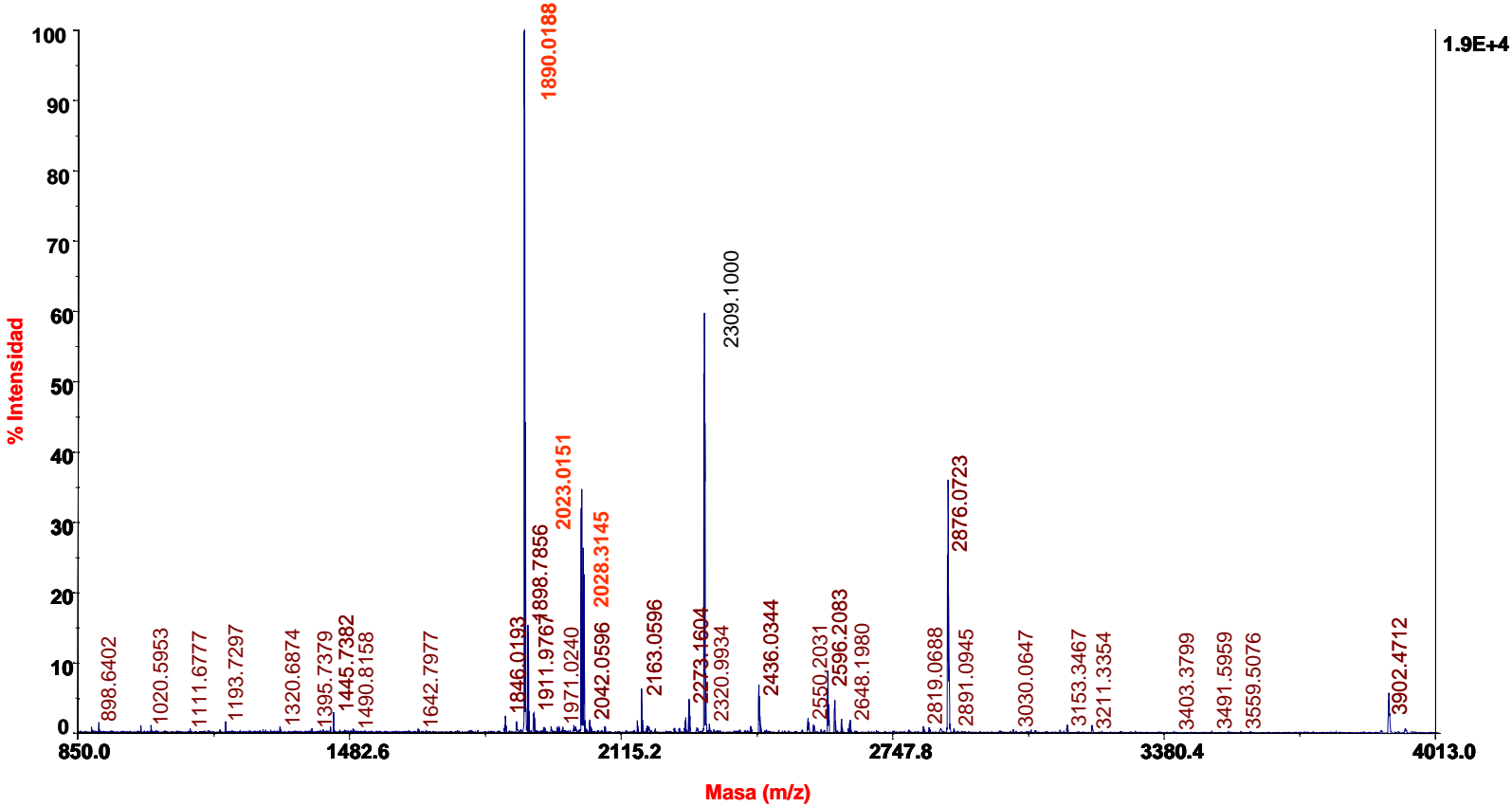
Análisis *de novo* ion m/z 2028,93 (AChi48)



Secuencia péptido m/z 2028,93 = **RGGAFFAQISHETGFGGAR** (*score*: 44,26)

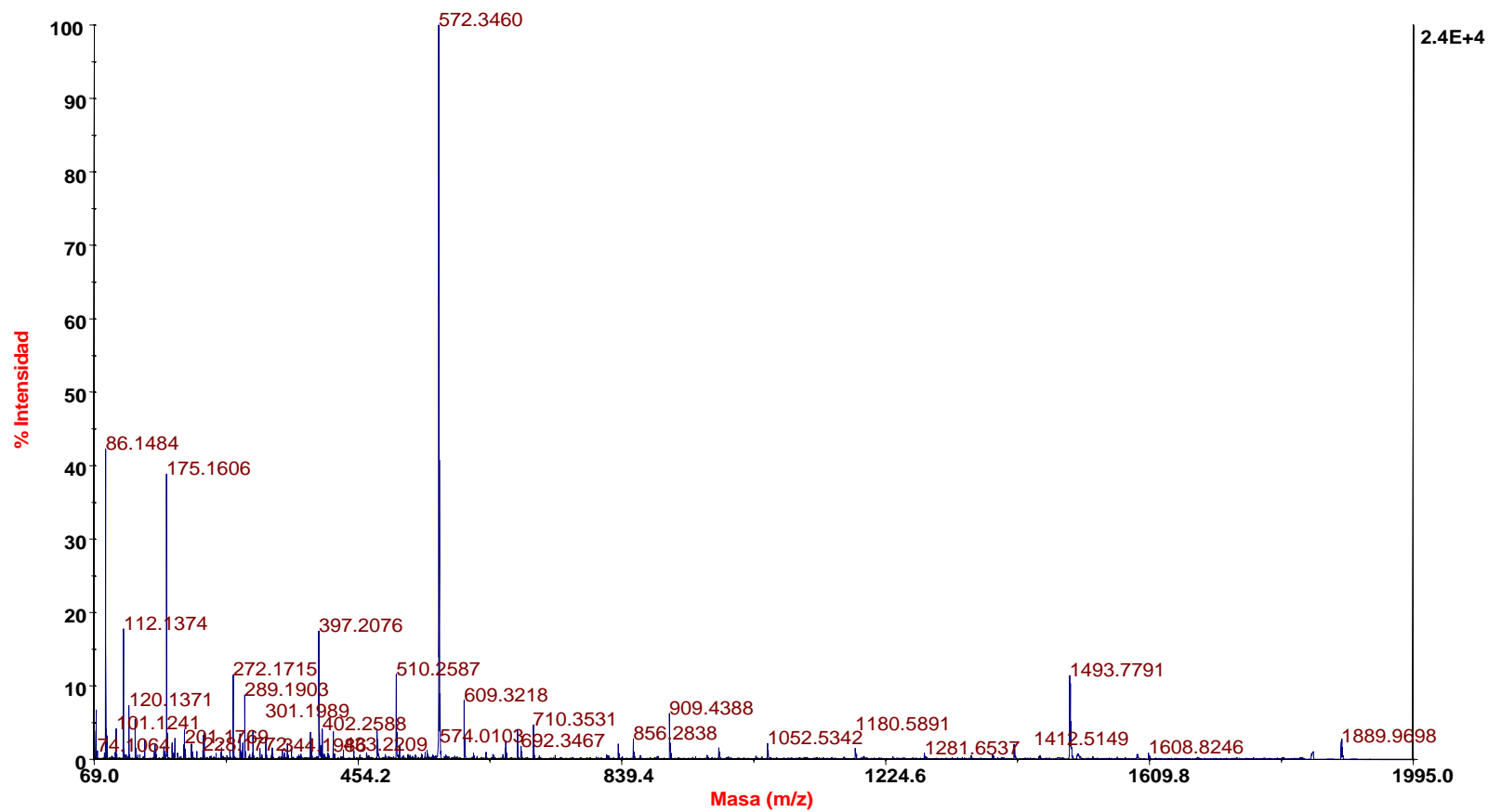
Huella peptídica AChi24

4700 Reflector Spec #1 MC=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>NF0.9[BP = 1891.0, 19023]

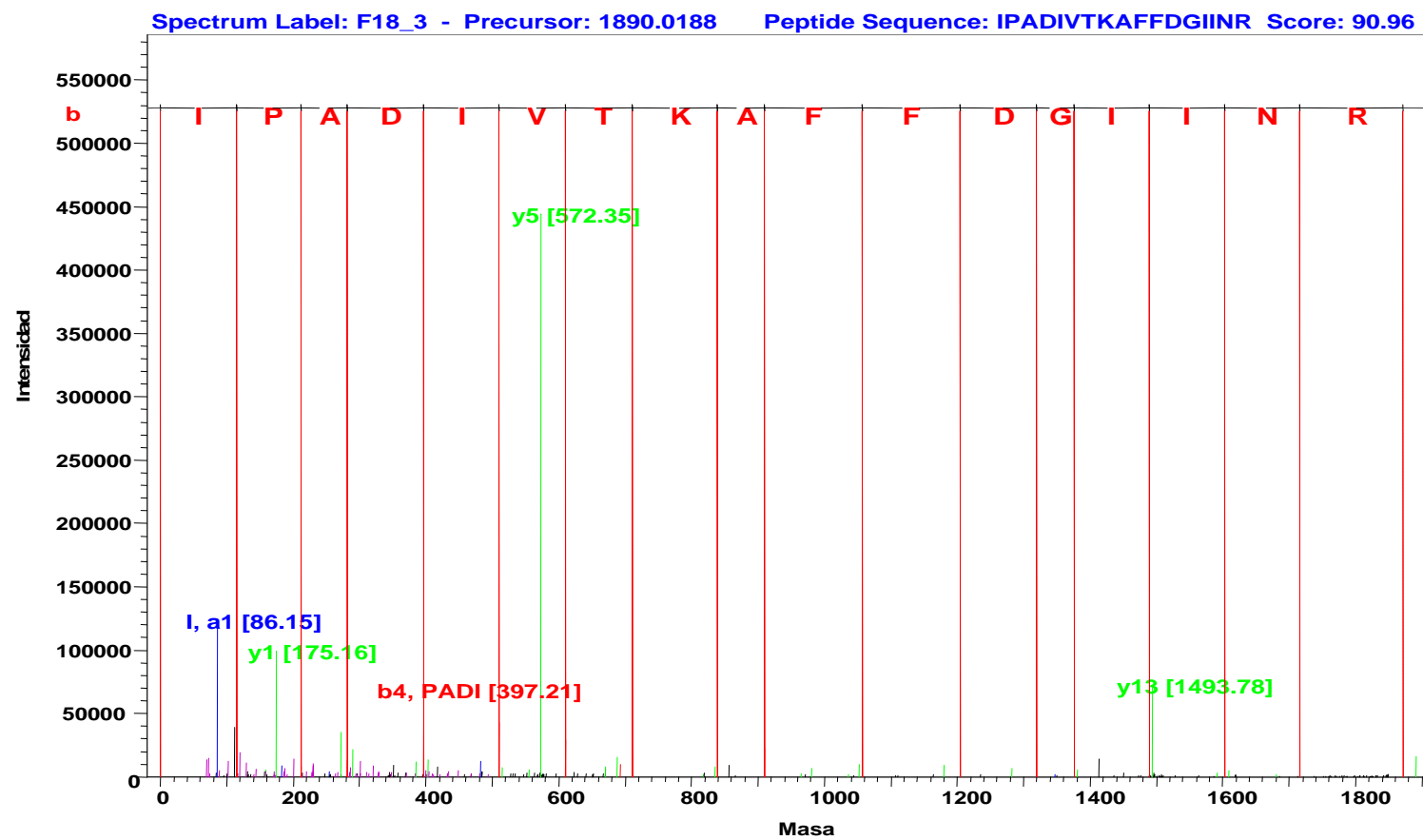


Espectro EM/EM ion m/z 1890,02 (AChi24)

4700 MS/MS Precursor 1890.02 Spec #1 MC=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>NF0.9[BP = 572.3, 24358]



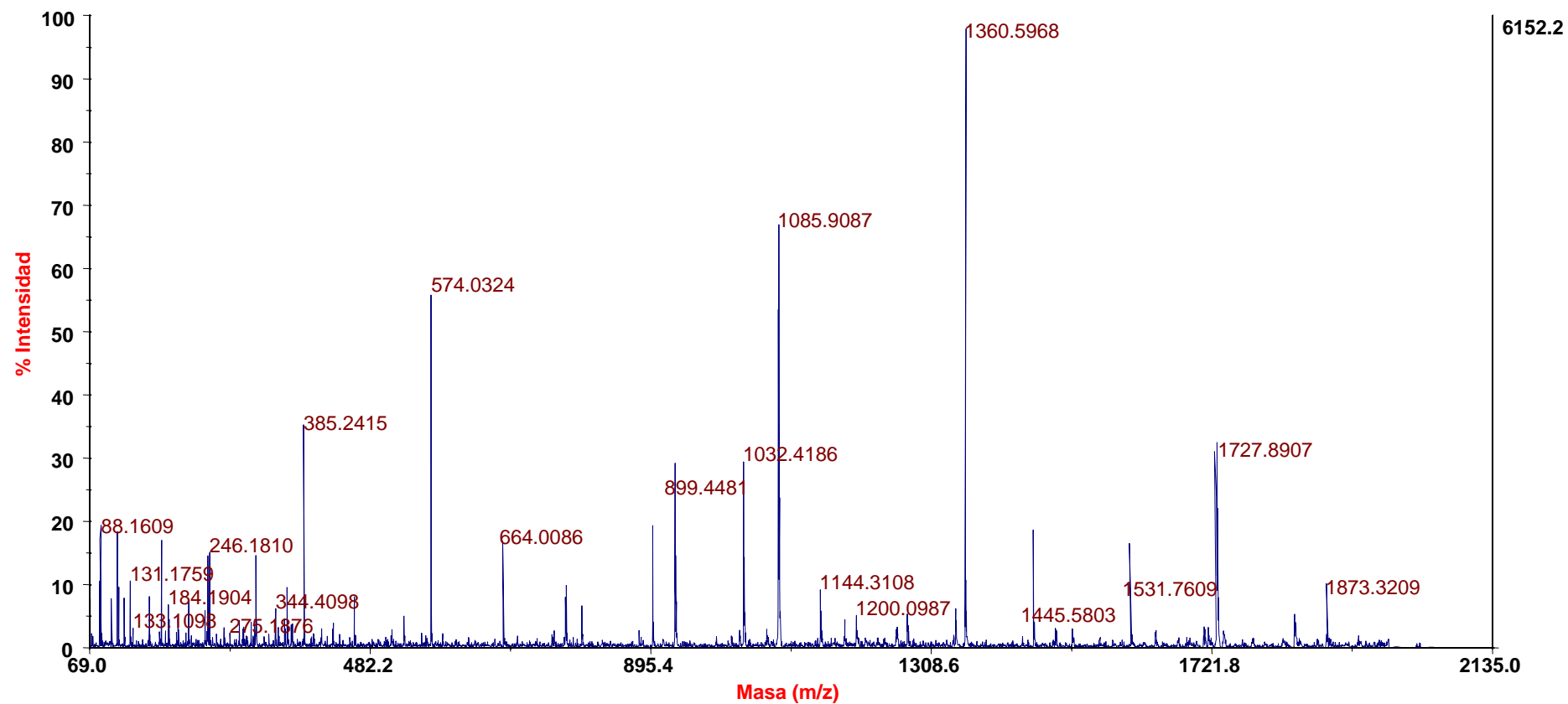
Análisis *de novo* ion m/z 1890,02 (AChi24)



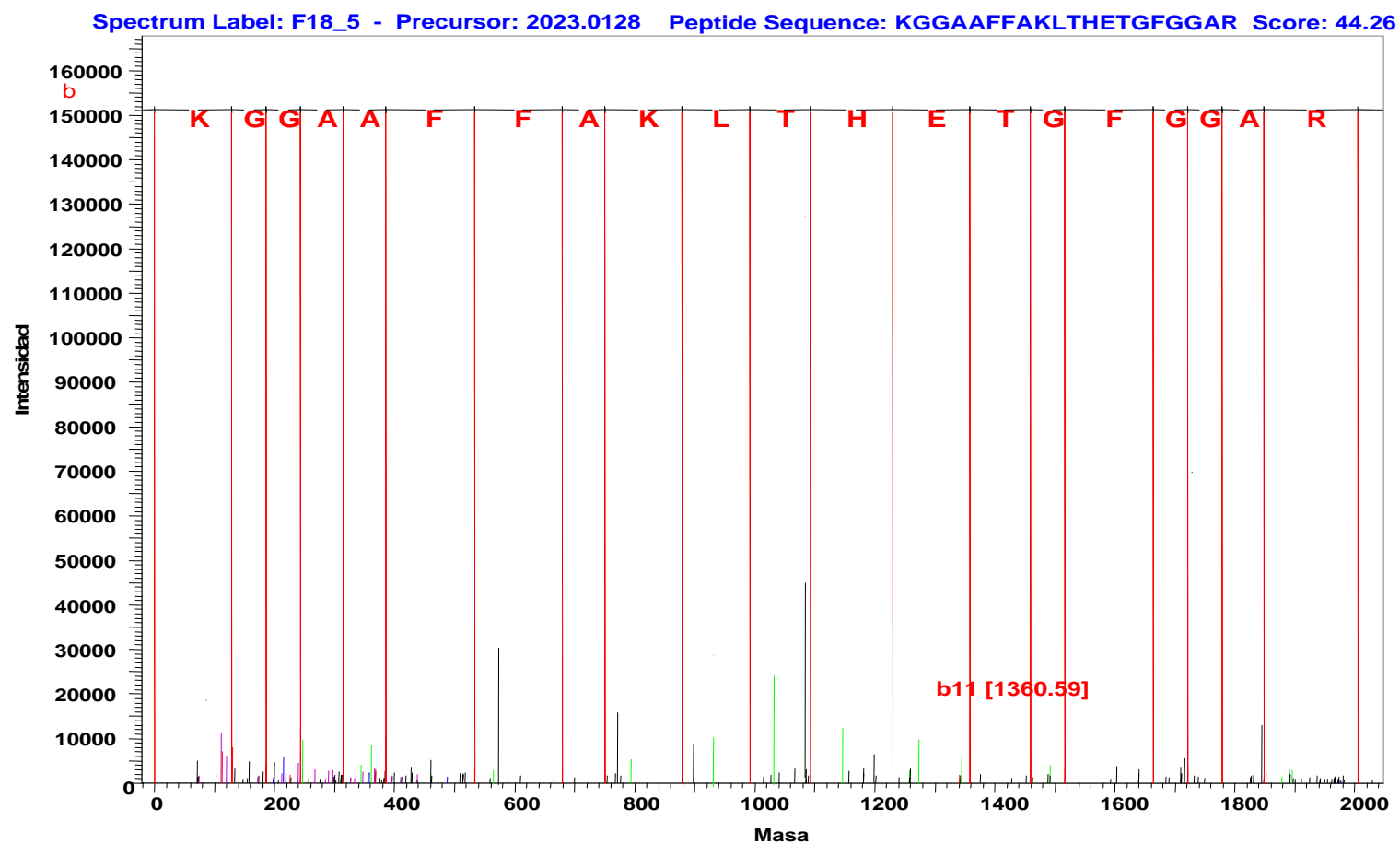
Secuencia péptido m/z 1890,02 = IPADIVTKAFFDGIINR (*score*: 90,96)

Espectro EM/EM ion m/z 2023,01 (AChi24)

4700 MS/MS Precursor 2023.01 Spec #1 MC=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>NF0.9[BP = 1360.6, 6152]



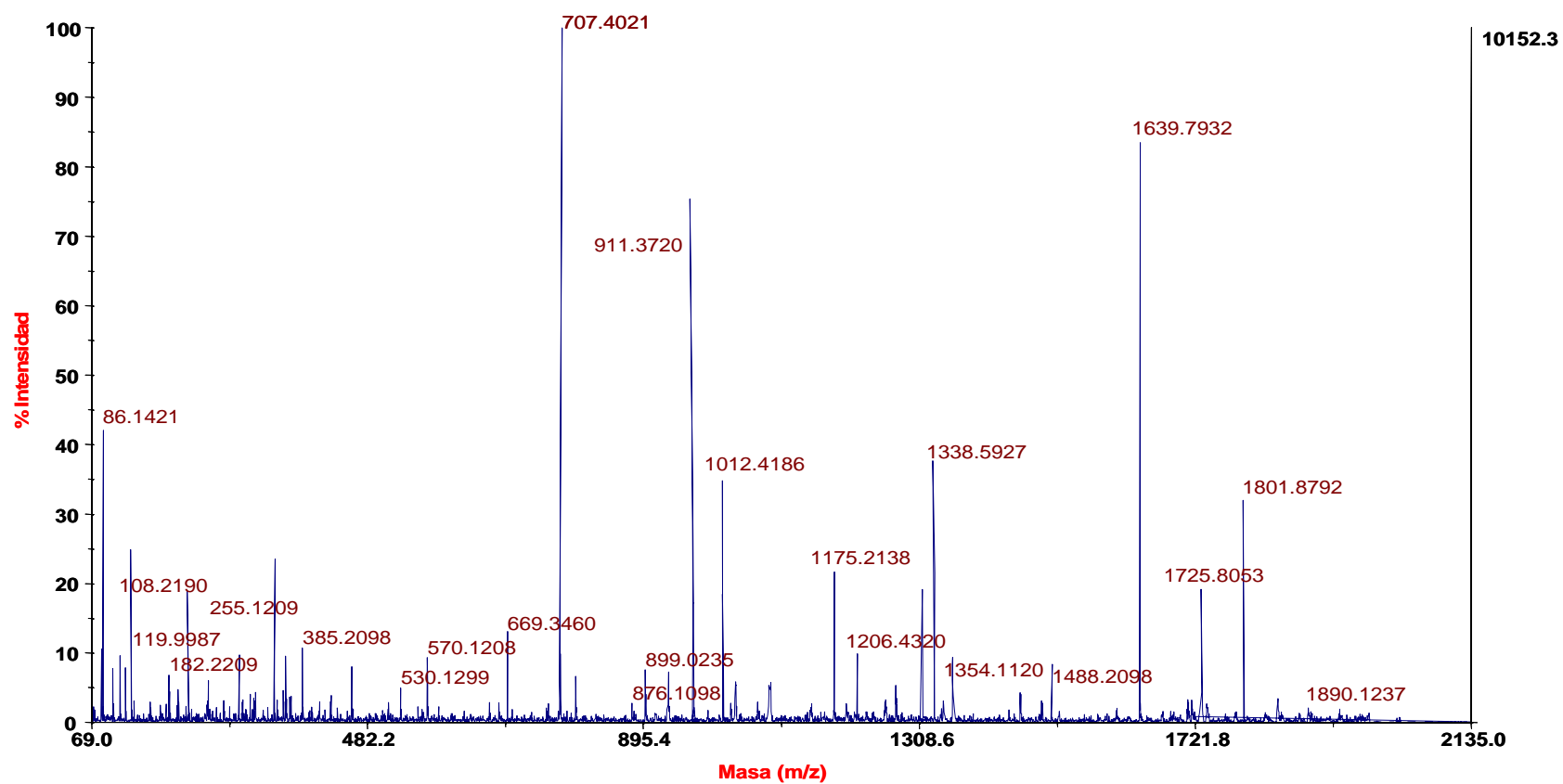
Análisis *de novo* ion m/z 2023,01 (AChi24)



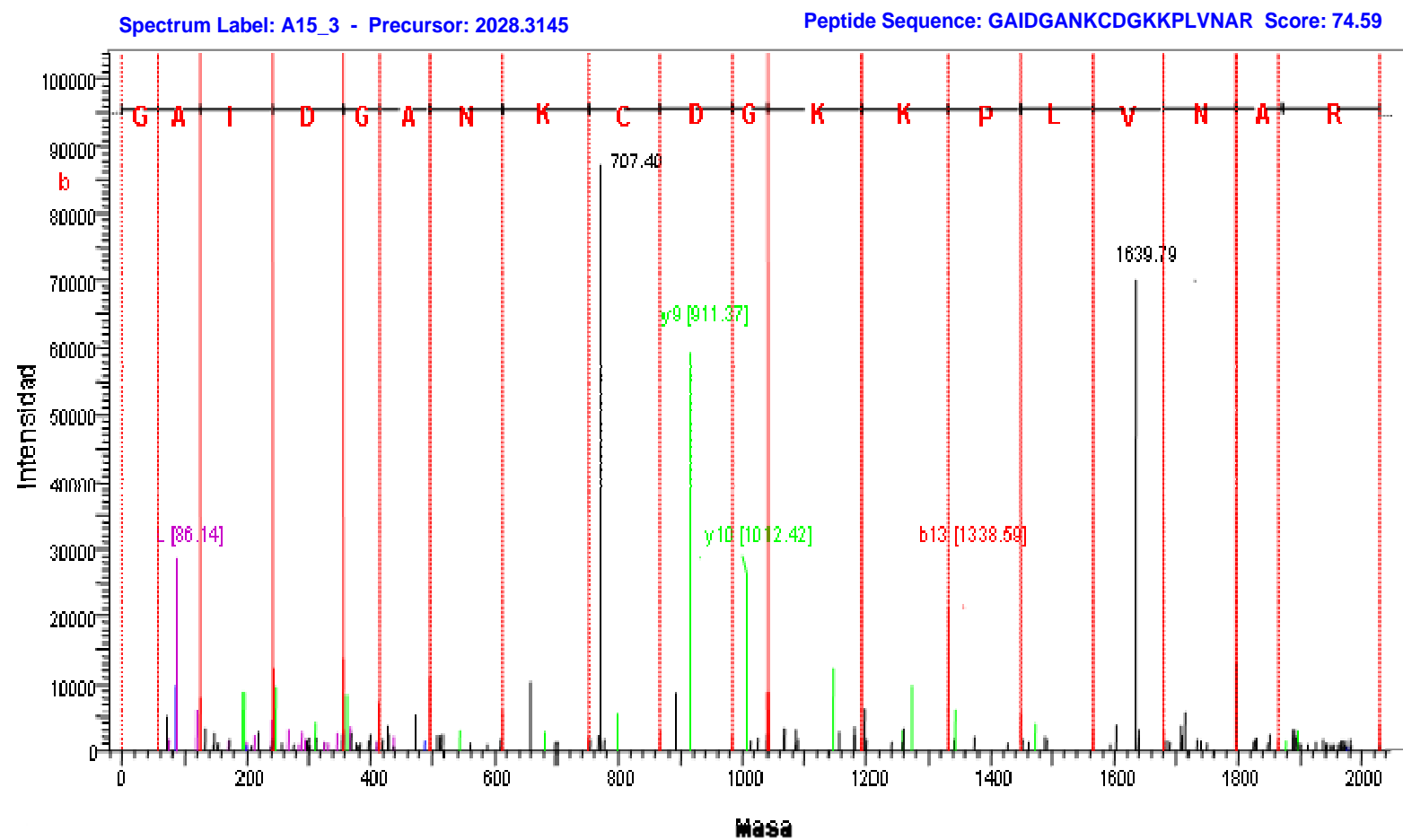
Secuencia péptido m/z 2023,01 = **KGGAFFAKLTHETGFGGAR** (*score*: 44,26)

Espectro EM/EM ion m/z 2028,31 (AChi24)

4700 MS/MS Precursor 2028.31 Spec #1 MC=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>NF0.9[BP = 770.4, 10152]



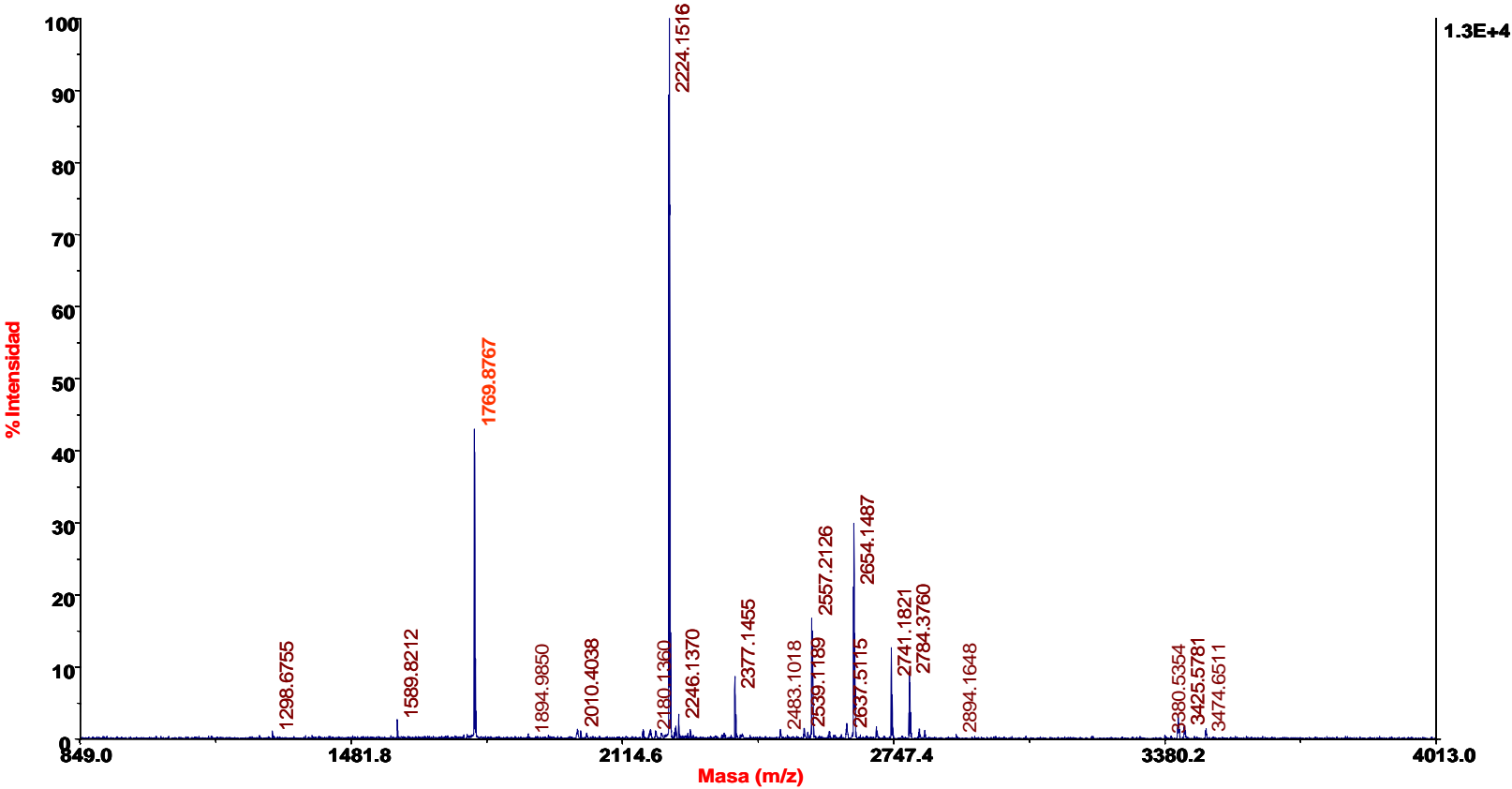
Análisis de novo ion m/z 2028,31 (AChi24)



Secuencia péptido m/z 2028,31 = **GAIDGANKCDGKKPTLVNAR** (score: 74,59)

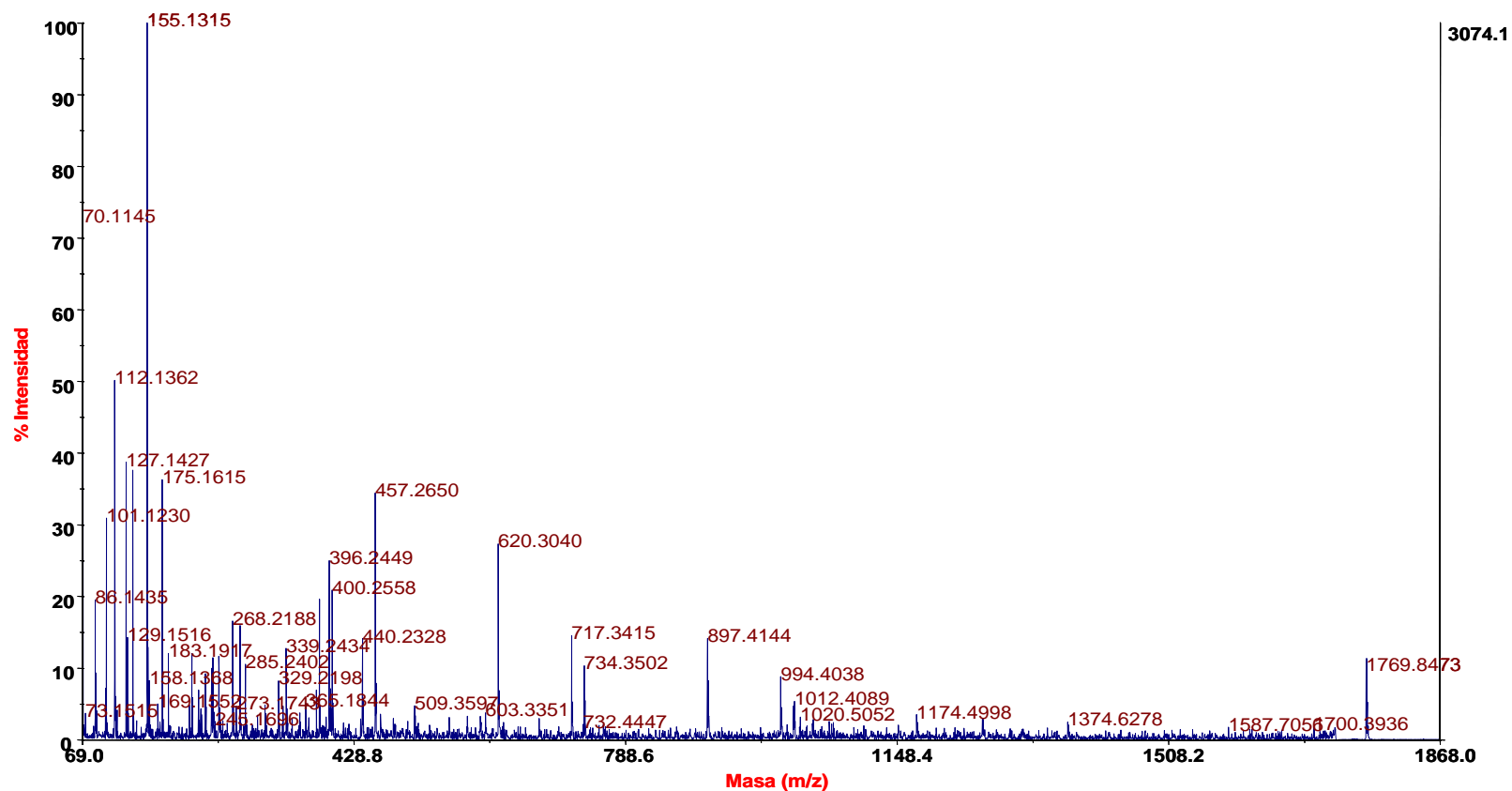
Huella peptídica AChi26

4700 Reflector Spec #1 MC=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>NF0.9[BP = 2225.2, 12862]



Espectro EM/EM ion m/z 1769,88 (AChi26)

4700 MS/MS Precursor 1769.88 Spec #1 MC=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>NF0.9[BP = 155.1, 3074]



Secuencia péptido m/z 1769,88 = **GPIQISYNNYGPAGR** (Mascot score: 67) Inhibidor α -amilasa/endoquitinasa [*Coix lacryma-jobi*] (P15326)

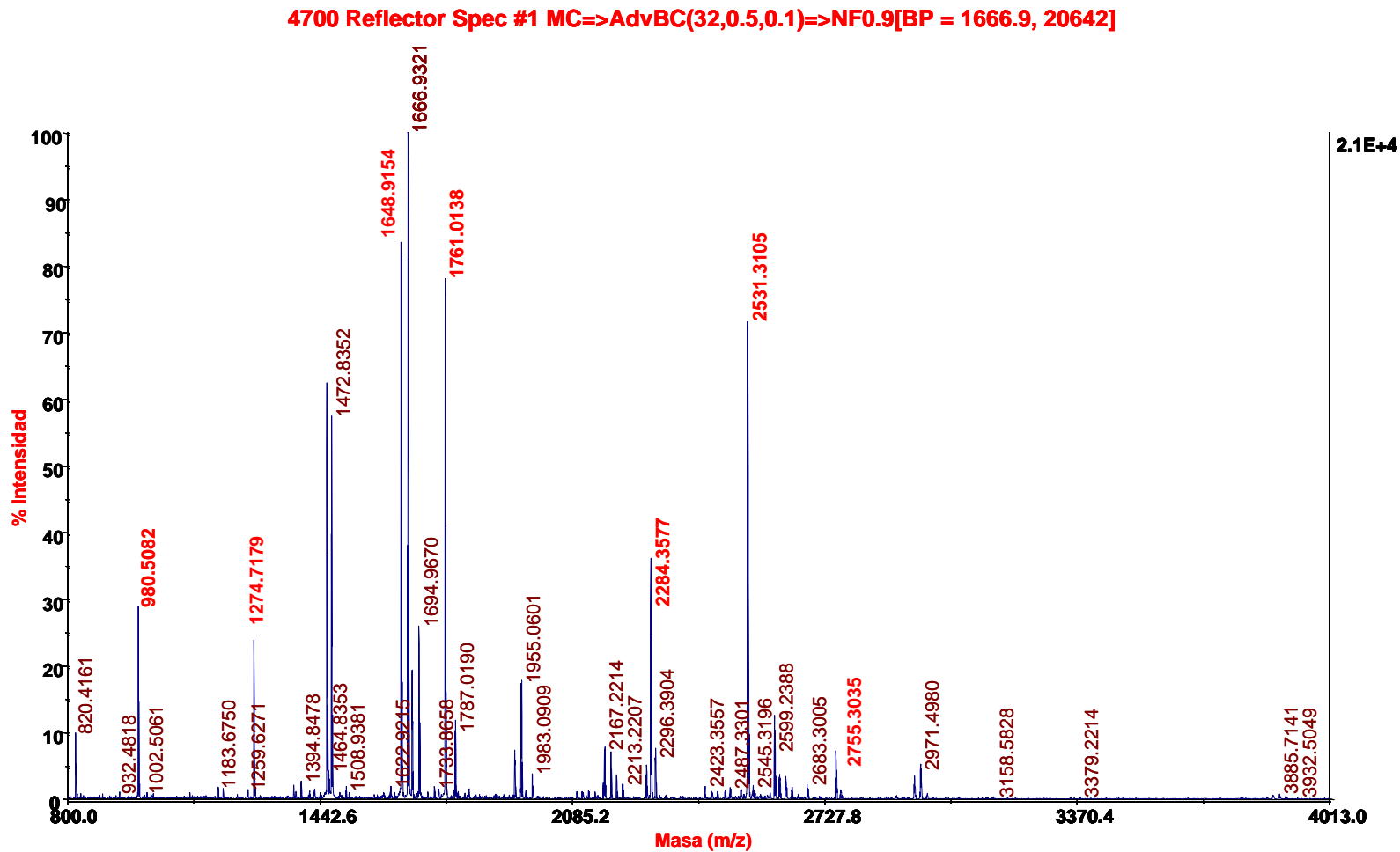
Identificación AChi26

> Inhibidor α-amilasa/endoquitinasa [*Coix lacryma-jobi*]

GI: 266324 (P15326)

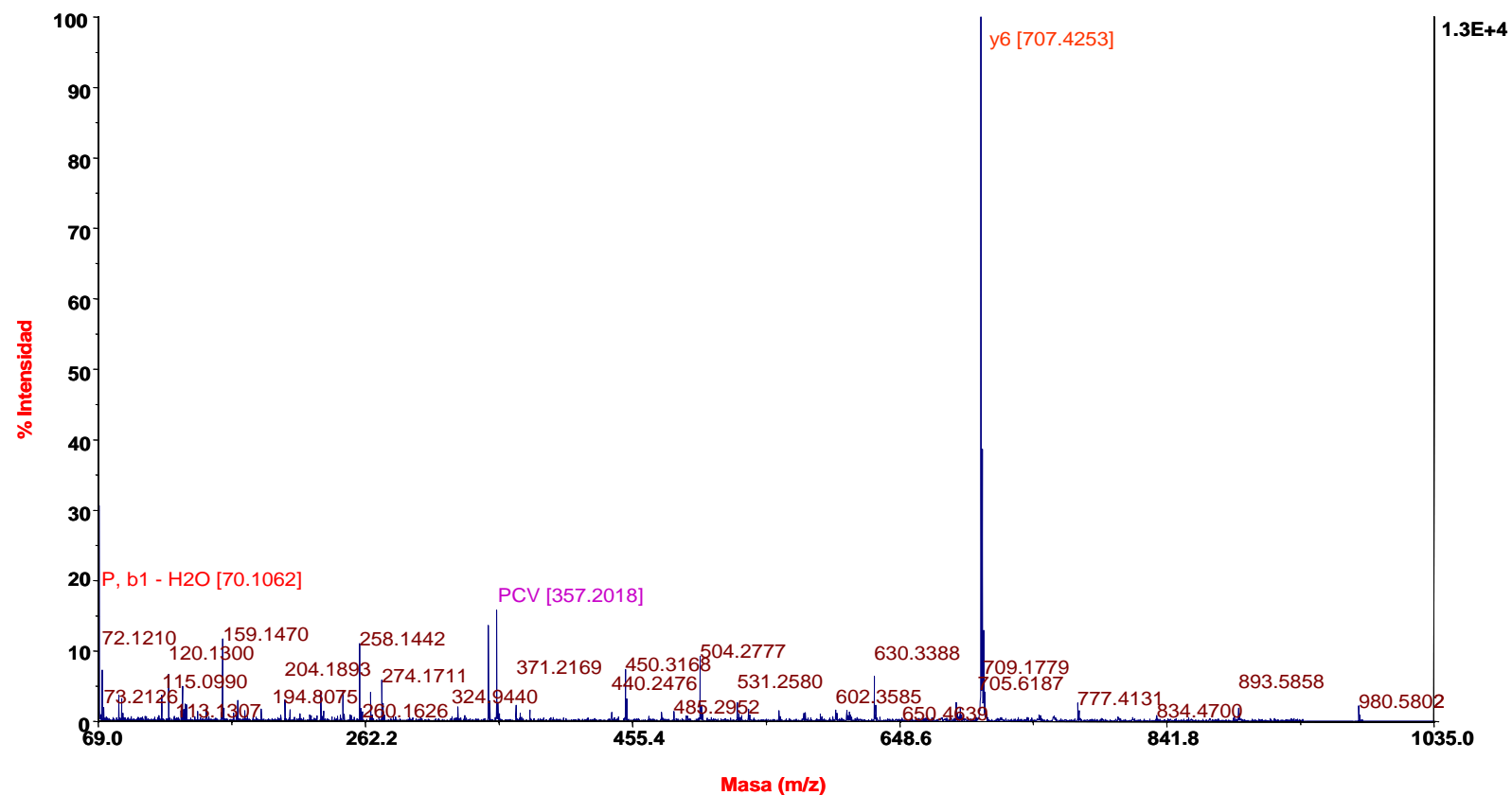
CCSKFGYCGLTDAYNFYTGQLTSFAHVTHETGNNAYCDPSKTQKPCAAGKKYYGR**GPIQISXNYYNYGPAGR**AIGMDGLGNPDRVAQ
DALD DYKTALXFLVNGEEAVPGLSAANAVSYRQYCQQLGVDPGPNL

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence	
56 - 71	1769.8765	1768.8692	1768.8532	0.0160	0	R.GPIQISYNYNYGPAGR.A	(Ions score 67)

Huella peptídica BChi33

Espectro EM/EM ion m/z 980,51 (BChi33)

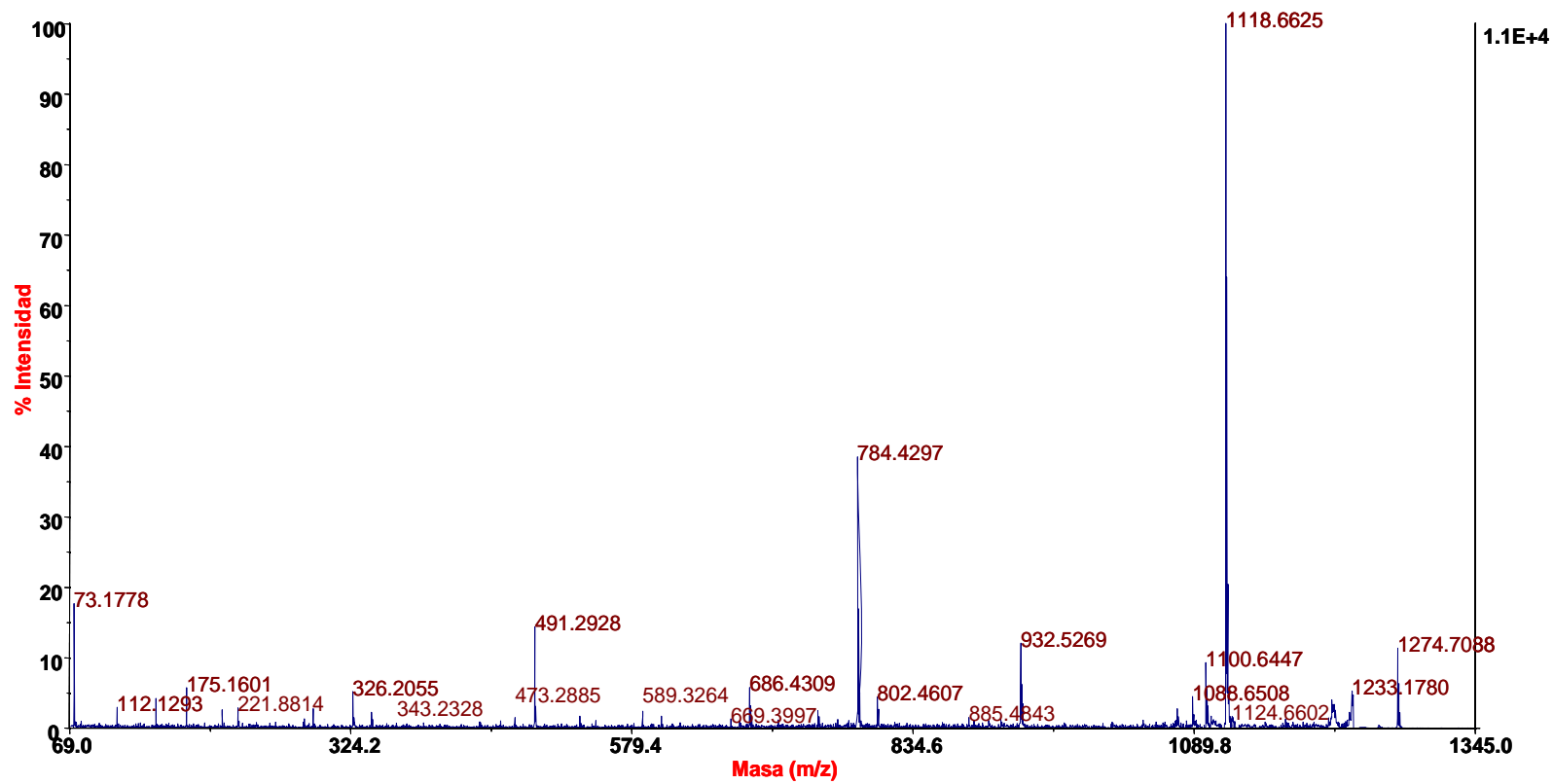
4700 MS/MS Precursor 980.506 Spec #1 MC=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>NF0.9[BP = 707.4, 12854]



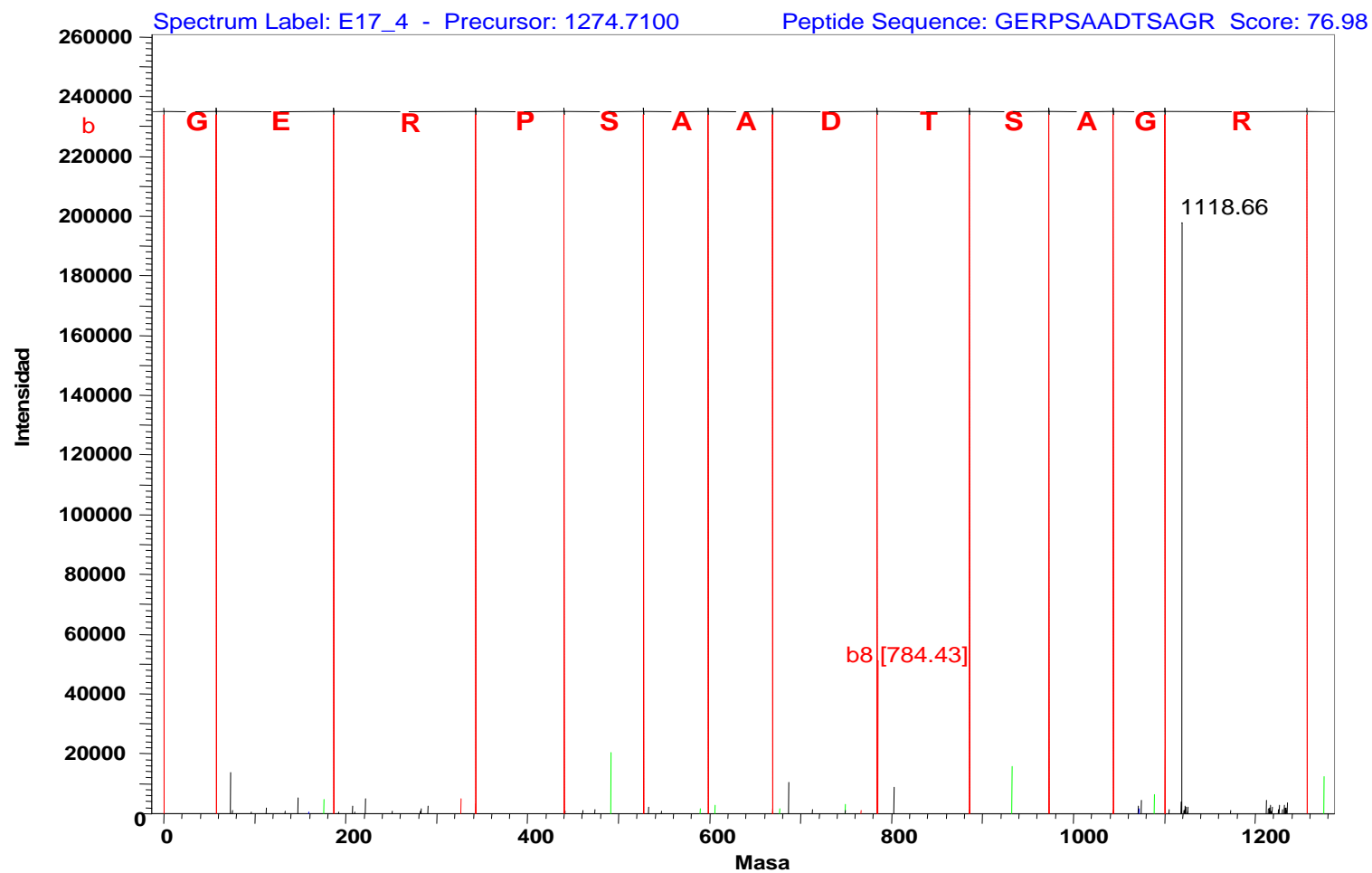
Secuencia péptido m/z 980,51 = **SWPCVFGK** (Mascot score: 38) Endoquitinasa [*Castanea sativa*] (AAB01895)

Espectro EM/EM ion m/z 1274,71 (BChi33)

4700 MS/MS Precursor 1274.71 Spec #1 MC=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>NF0.9[BP = 1118.7, 11344]



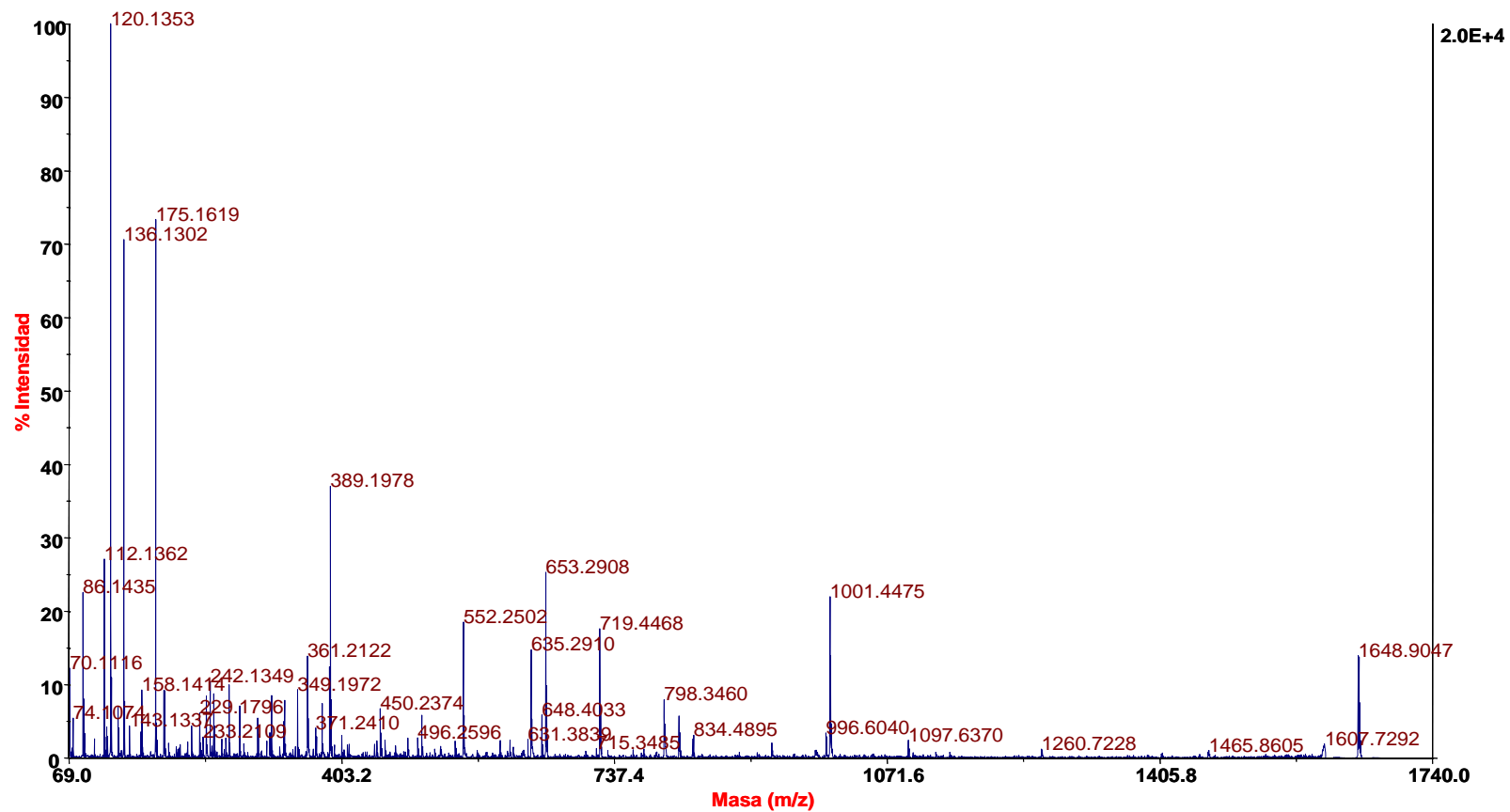
Análisis *de novo* ion m/z 1274,71 (BChi33)



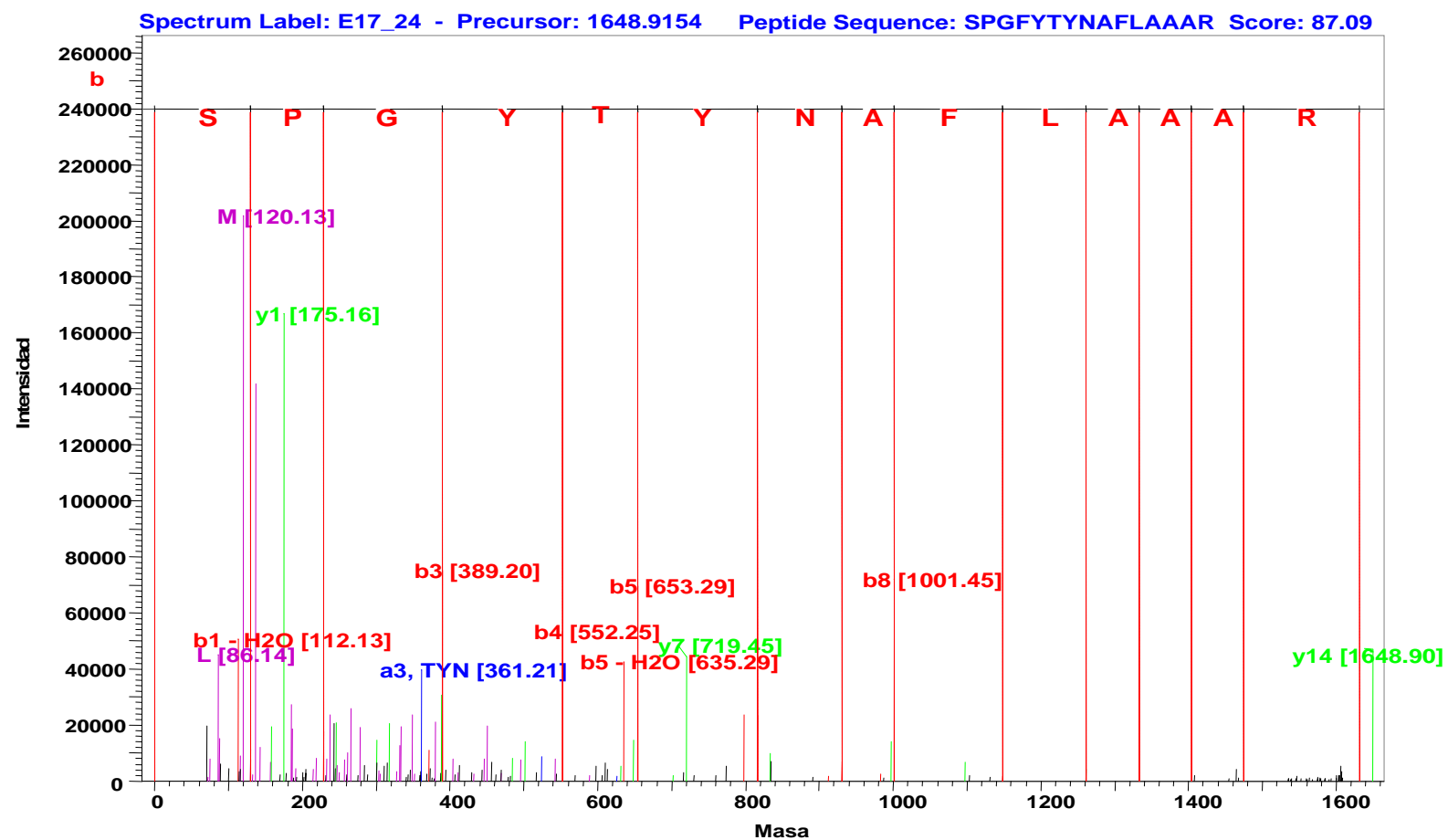
Secuencia péptido m/z 1274,71 = **GERPSAADTSAGR** (*score*: 76,98).

Espectro EM/EM ion m/z 1648,91 (BChi33)

4700 MS/MS Precursor 1648.91 Spec #1 MC=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>NF0.9[BP = 120.1, 20037]

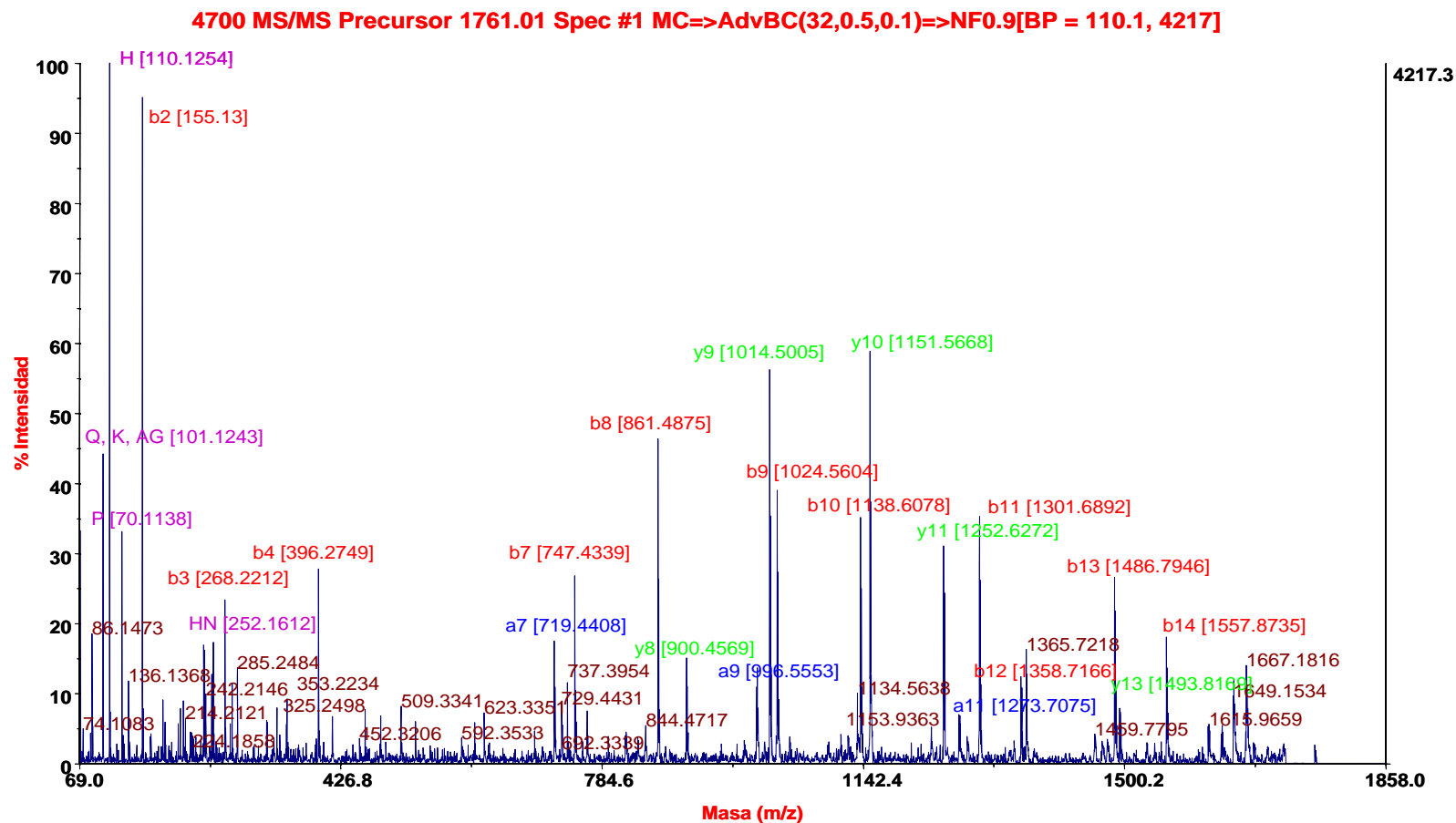


Análisis *de novo* ion m/z 1648,91 (BChi33)



Secuencia péptido m/z 1648,91 = **SPGFYTYNAFLAAAR** (*score*: 87,09)

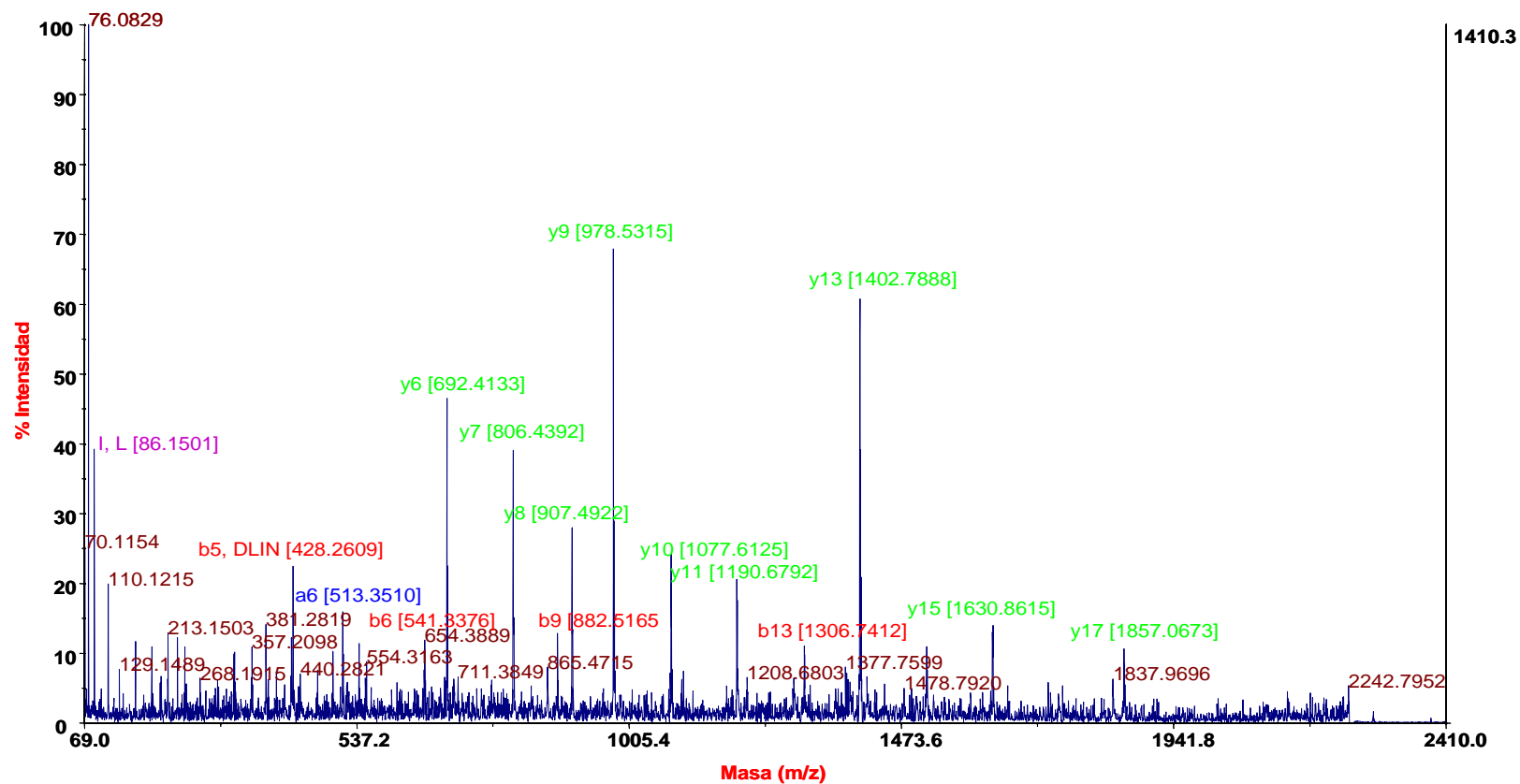
Espectro EM/EM ion m/z 1761,01 (BChi33)



Secuencia péptido m/z 1761,01 = **GPIQLTHNYYNYGQAGK** (Mascot score: 118) Endoquitinasa [*Castanea sativa*] (AAB01895)

Espectro EM/EM ion m/z 2284,36 (BChi33)

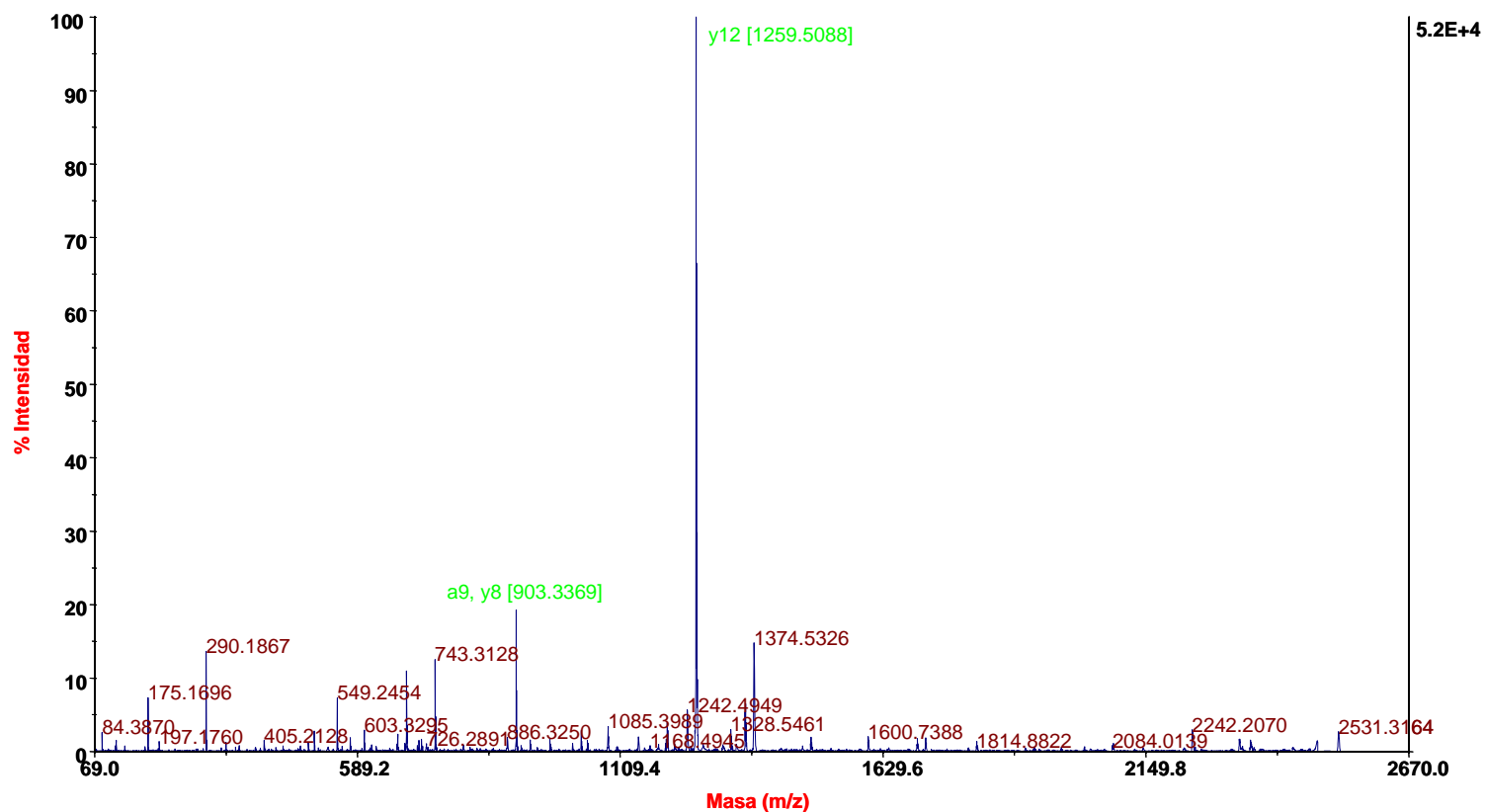
4700 MS/MS Precursor 2284.36 Spec #1 MC=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>NF0.9[BP = 76.1, 1410]



Secuencia péptido m/z 2284,36 = **AIGADLINNPDLVATNPTISFK** (score: 61) Endoquitinasa [*Castanea sativa*] (AAB01895)

Espectro EM/EM ion m/z 2531,31 (BCh133)

4700 MS/MS Precursor 2531.31 Spec #1 MC=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>NF0.9[BP = 1259.5, 52098]



Secuencia péptido m/z 2530,32 = **VPSYGVITNIINGGLECGHGSDDR** (score: 85)

Endoquitinasa [*Castanea sativa*] (AAB01895)

Identificación BChi33

>Endoquitinasa [*Castanea sativa*]

GI: 1354129 (AAB01895)

MKLFSLLLFLAFLLGTSAEQCGRQAGGAACANNLCCSQFGWCGNTAEYCGAGCQSQCSSPTTTTSSPTASSGGGGDVGSLISASLFDQML
KYRNDPRCKSNGFYTYNAFIAAARSFNGFGTTGDVTTRKRELAFLAQTSHETTTGGWATAPDGPYAWGYCFVMENNKQTYCTSKSW
PCVFGKQYYGRGPIQLTHNYNYGQAGKAIGADLINNPDLVATNPTISFKTAIWFWMTPQANKPSSHDVIIGNWRPSAADTSAGRVPSY
GVITNIINGGLECGHGSDDRANRIGFYKRYCDTLGVSYGNNLDCYNQKPFA

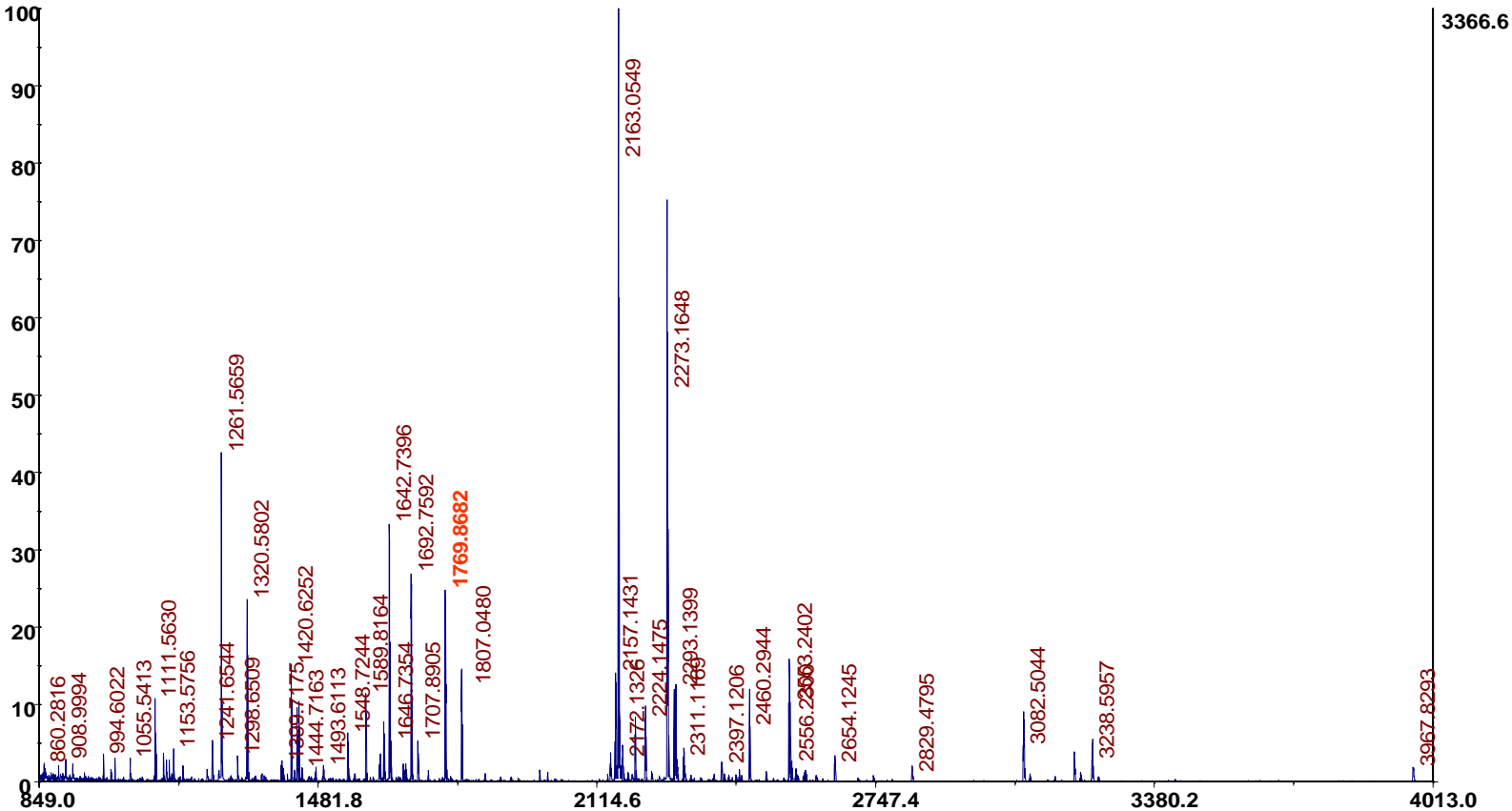
Listado de masas identificadas:

980,5059/ 1761,0138/ 1953,7909/ 2284,2488/ 2284,3582/ 2530,3176/ 2599,3000/ 2755,3035/ 2755,4614

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Sequence
98 - 114	1953.7909	1952.7836	1952.9202	-0.1366	1	R.CKSNGFYTYNAFIAAAR.S (No match)
175 - 182	980.5059	979.4986	979.4585	0.0401	0	K.SWPCVFGK.Q (Ions score 35)
188 - 203	1761.0138	1760.0065	1759.8641	0.1424	0	R.GPIQLTHNYNYGQAGK.A (Ions score 118)
204 - 225	2284.2488	2283.2415	2283.2110	0.0305	0	K.AIGADLINNPDLVATNPTISFK.T (No match)
204 - 225	2284.3582	2283.3509	2283.2110	0.1399	0	K.AIGADLINNPDLVATNPTISFK.T (Ions score 61)
261 - 284	2530.3176	2529.3103	2529.1917	0.1186	0	R.VPSYGVITNIINGGLECGHGSDDR.V (Ions score 85)
294 - 316	2755.3035	2754.2962	2754.2166	0.0797	1	K.RYCDTLGVSYGNNLDCYNQKPFA.- (Ions score 5)
294 - 316	2755.4614	2754.4541	2754.2166	0.2376	1	K.RYCDTLGVSYGNNLDCYNQKPFA.- (No match)
295 - 316	2599.3000	2598.2927	2598.1155	0.1773	0	R.YCDTLGVSYGNNLDCYNQKPFA.- (No match)

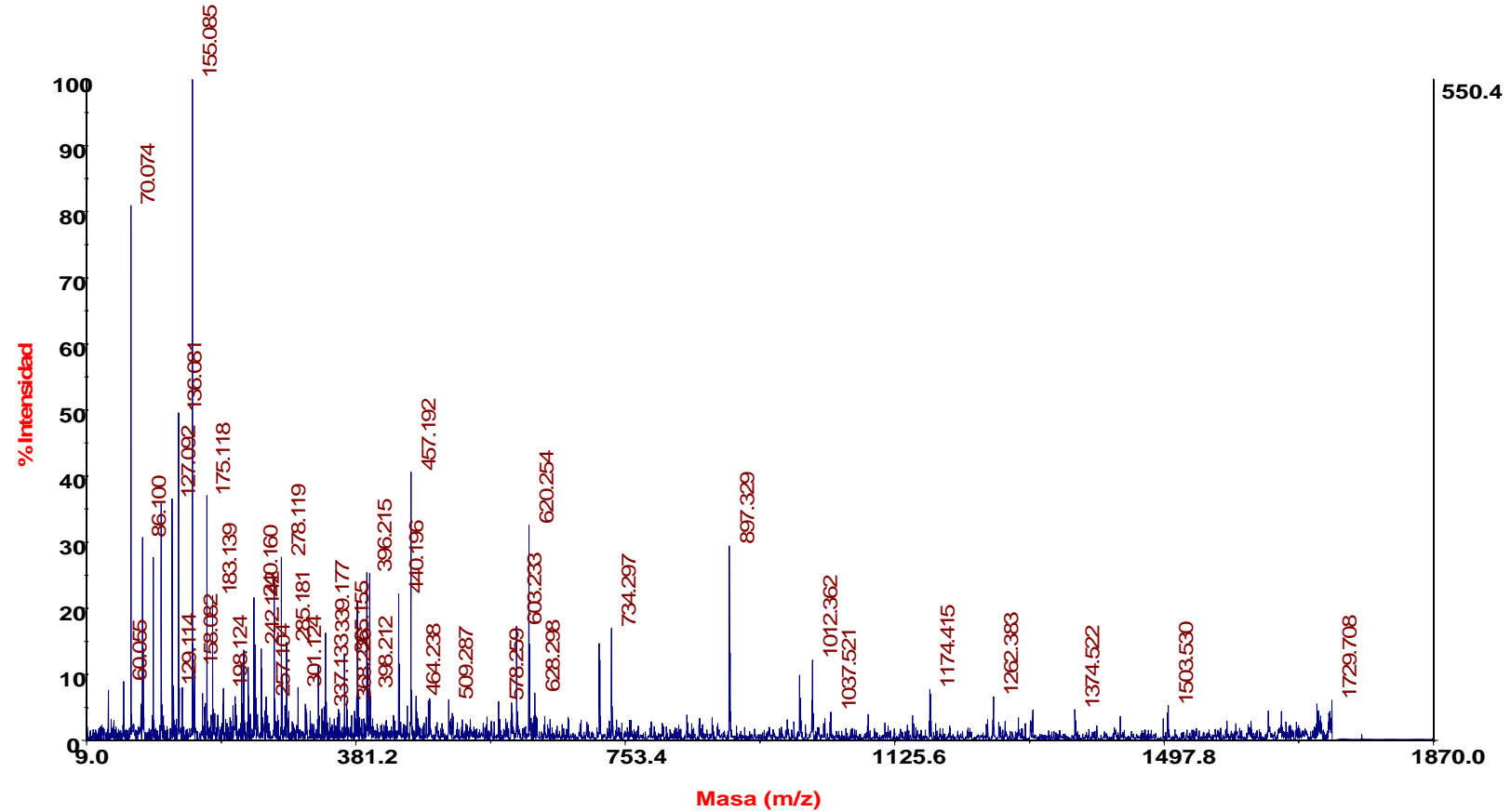
Huella peptídica BChi14

4700 Reflector Spec #1 MC=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>NF0.9[BP = 2164.1, 3367]



Espectro EM/EM ion m/z 1769,87 (BChi14)

4700 MS/MS Precursor 1769.87 Spec #1 MC=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>NF0.9[BP = 155.1, 550]



Secuencia péptido m/z 1769,87 = **GPIQISYNNYGPAGR** (score: 80) Endoquitinasa [*Triticum aestivum*] (CAA53626)

Identificación BChi14

>Endoquitinasa [*Triticum aestivum*]

GI: 416029 (CAA53626)

MRGVVVVAMLAFAVSAHAEQCGSQAGGATCPNCLCCSKFGFCGSTSDYCGNGCQSQCNCGSGGGTPVPVPTPTGGGVSSIISQSLFD
QMLLHRNDAACQAKGFYNYGAFVAAANSFSGFAT'TGGADVRRKREVAFLAQTSHET'TGGWPTAPDGPYSWGYCFNQERGAASDYCSP
NSQWPCAPGKK**YFGRGPIQISYNYNYGPAGR**AIGTDLLNNPDLVATDATVSFKTALWFWMTQSPKPSSHDVITGRWSPSGADQ
AAGRVPGYGVITNIINGGLECGRGQDGRVADRIGFYKR**YCDLLGVTYGDNLDCYNQRPFA**

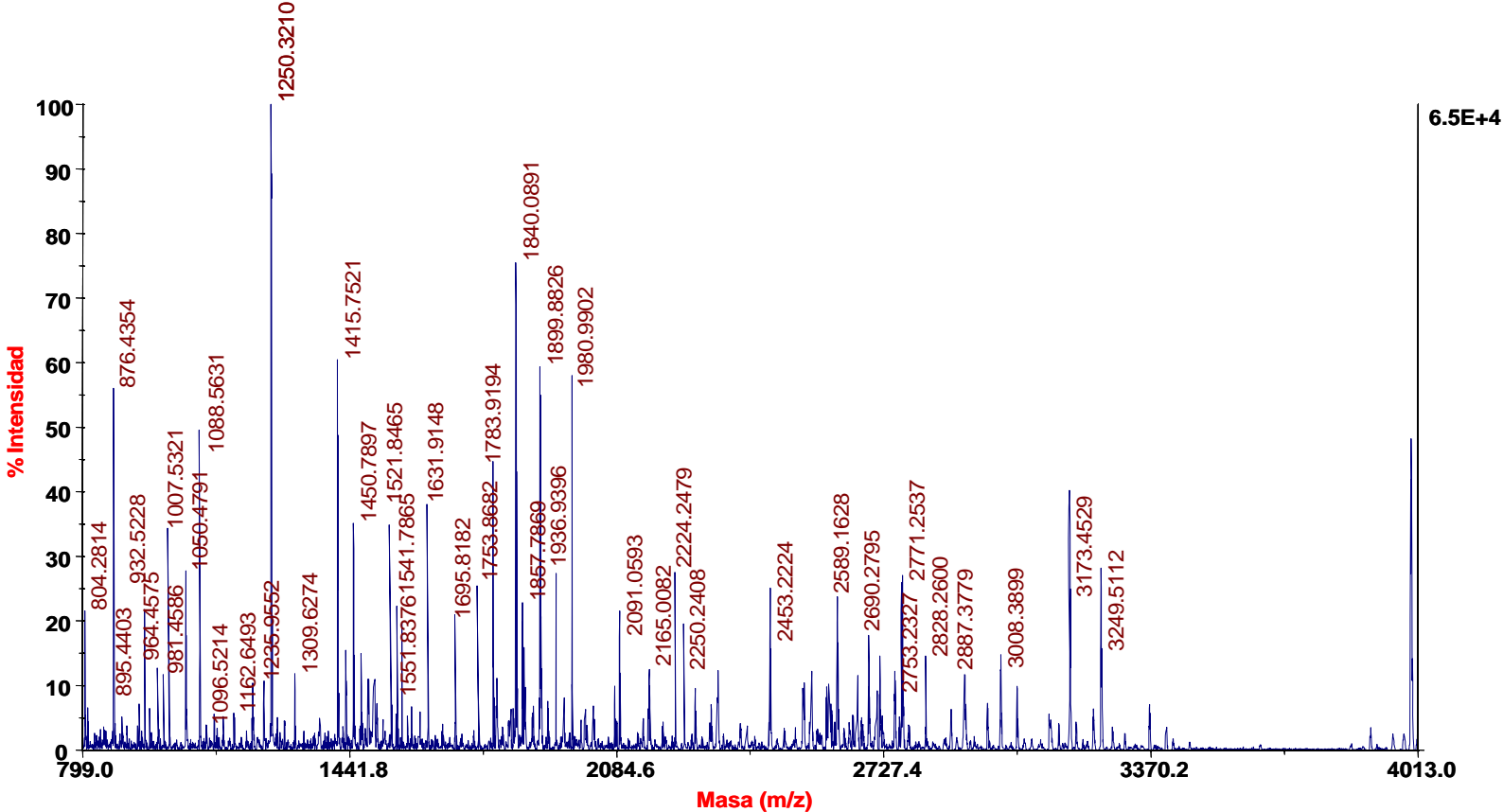
Listado de masas identificadas:

1769,8680/ 2293,1392/ 2654,1216

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Sequence
188 - 207	2293.1392	2292.1319	2292.1075	0.0244	1	K.YFGRGPIQISYNYNYGPAGR.A (No match)
192 - 207	1769.8680	1768.8607	1768.8532	0.0075	0	R.GPIQISYNYNYGPAGR.A (Ions score 80)
192 - 207	1769.8680	1768.8607	1768.8532	0.0075	0	R.GPIQISYNYNYGPAGR.A (No match)
299 - 320	2654.1216	2653.1143	2653.1577	-0.0433	0	R.YCDLLGVTYGDNLDCYNQRPFA.- (No match)

Huella peptídica AGlu19

4700 Reflector Spec #1 MC=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>NF0.9[BP = 1250.3, 65068]



Identificación AGlu19

> glucan endo-1,3-β-D-glucosidasa [*Solanum lycopersicum*]

GI: 498926 (CAA52872)

MACTKLHFPITATITLLVILILATLDFTGAQTGVCYGR**NGNGLPSPADVVALCNRR**NNIRRMRIYDPHQPTLQALRGSNIELILGVQILTFR
ISASSQANANRWVKHVRNYGNVKFRYIAVGNEVSPLNGNAQYVPFVINAMRNIQNAISGAGLGNQIK**VSTAIETELTTDTYPPSR**GKF
KDNVR**GYVDPIIR**FLVANRSPLLVNIYPYFAIANNQAIK**LDYALFTSPGVVVNDNGR**EYR**NLFDALLDATYSALEK**AGGSSLDIVVSES
GWPSAGAGQLTSIDNAR**TYNNNLIR**HVKRGSPK**RPSKPIEAYIFALFNENLK**SPEIEK**HFGLFTPNR**QPKYPISFN

Listado de masas identificadas:

932,5228/ 1007,5321/ 1088,5631/ 1309,6274/ 1551,8376/ 1753,8682/ 1783,9194/ 1936,9396/ 1980,9902/ 2250,2408

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
38 - 54	1753.8682	1752.8609	1752.8577	2	0	R.NGNGLPSPADVVALCNR.N
62 - 74	1551.8376	1550.8303	1550.8205	6	0	R.IYDPHQPTLQALR.G
158 - 175	1980.9902	1979.9829	1979.9688	7	0	K.VSTAIETELTTDTYPPSR.G
184 - 191	932.5228	931.5155	931.5127	3	0	R.GYVDPIIR.F
218 - 235	1936.9396	1935.9323	1935.9691	-19	0	K.LDYALFTSPGVVVNDNGR.E
239 - 254	1783.9194	1782.9121	1782.9039	5	0	R.NLFDALLDATYSALEK.A
285 - 292	1007.5321	1006.5248	1006.5196	5	0	R.TYNNNLIR.H
301 - 319	2250.2408	2249.2335	2249.2208	6	0	K.RPSKPIEAYIFALFNENLK.S
326 - 334	1088.5631	1087.5558	1087.5563	-0	0	K.HFGLFTPNR.Q

ANEXO III

A continuación se muestra el árbol filogenético construido a partir del alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos del gen *18S* ARNr del organismo *Annona cherimola* y otras especies vegetales. La información de las secuencias se obtuvo en la base de datos del NCBI. Se indican en **azul** aquellos organismos cuyo genoma esta totalmente secuenciado o cerca de su finalización (Mayo 2010). Los valores situados en las ramas representan los porcentajes *bootstrap* para 100 replicas



ANEXO IV

Parte de los resultados plasmados en esta memoria de investigación han sido publicados en revistas de ciencia indexadas por el SCI (*science citation index*) y/o han dado lugar a patentes de aplicación.

Publicaciones

Goñi, O., Muñoz, M., Cabello, J.R., Escribano, M.I., Merodio, C. 2007. Changes in water status of cherimoya fruit during ripening. *Postharvest Biology and Technology* 45: 147-150.

Goñi, O., Escribano, M.I., Merodio, C. 2007. Gelatinization and retrogradation on native starch from cherimoya fruit during ripening, using differential scanning calorimetry. *LWT-Food Science and Technology* 41: 303-310.

Goñi, O., Sanchez-Ballesta, M.T., Escribano, M.I., Merodio, C. 2009. Regulation of defence and cryoprotective proteins by high levels of CO₂ in *Annona* fruit stored at chilling temperature. *Journal of Plant Physiology* 166: 246-258.

Goñi, O., Sanchez-Ballesta, M.T., Merodio, C., Escribano, M.I. 2010. Ripening-related defense proteins in *Annona* fruit. *Postharvest Biology and Technology* 55: 169–173.

Goñi, O., Sanchez-Ballesta, M.T., Merodio, C., Escribano, M.I. 2010. Potent cryoprotective activity of cold and CO₂-regulated cherimoya (*Annona cherimola*) endochitinase. *Journal of Plant Physiology* (en prensa).

Patentes y modelos de utilidad

Escribano, M.I., Merodio, C., Goñi, O. Proteína crioprotectora con actividad quitinasa a bajas temperaturas, procedimiento para su obtención y aplicaciones. N°: P200801914; País de prioridad: España; Fecha de prioridad: 26-Junio-2008; Entidad titular: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Escribano, M.I., Merodio, C., Goñi, O. Proteína crioprotectora con actividad 1,3-β-glucanasa a bajas temperaturas, procedimiento para su obtención y sus aplicaciones. N°: P200801931; País de prioridad: España; Fecha de prioridad: 27-Junio-2008; Entidad titular: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Escribano, M.I., Merodio, C., Goñi, O. Endoquitinasa ácida activa a bajas temperaturas , procedimiento de obtención y usos. N°: P200930266; País de prioridad: España; Fecha de prioridad: 4-Junio-2009; Entidad titular: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Available online at www.sciencedirect.com

Postharvest Biology and Technology 45 (2007) 147–150

**Postharvest
Biology and
Technology**
www.elsevier.com/locate/postharvbio

Research note

Changes in water status of cherimoya fruit during ripening

Oscar Goñi, Maite Muñoz, Jesús Ruiz-Cabello¹, María I. Escribano, Carmen Merodio*

Departamento de Ciencia y Tecnología de Productos Vegetales, Instituto del Frío, IF-CSIC, José Antonio Novais 10,
Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain

Received 28 July 2006; accepted 15 January 2007

Abstract

Changes in the state of water of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) fruit during ripening were monitored using differential scanning calorimetry (DSC) and magnetic resonance imaging (MRI) techniques. The stage of ripening was determined by analyzing the changes in titratable acidity, firmness and total soluble solids contents. Furthermore, quantitative measurements of solutes such as proline, sucrose, glucose and fructose were also studied. The significant increase in the transverse relaxation time (T_2) values and the loss of flesh firmness during the initial stage of ripening are consistent with the sustained drop in the unfreezable water weight fraction according to the DSC data. The ripe stage of the fruit was marked by minimum longitudinal relaxation time (T_1) values and a rapid upsurge in the unfreezable water weight fraction, greatly influenced by the osmotic adjustments prompted by the significant accumulation of soluble sugars, proline and carboxylates. Changes in structure and solute concentration associated with ripening can be analyzed simultaneously, determining fruit water status by DSC.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Transverse and longitudinal relaxation times; Unfreezable water; Solutes; DSC; MRI; Cherimoya

1. Introduction

As water plays an important role in fruit growth, ripening and postharvest storage, accurate measurement of water status is extremely useful, and a considerable amount of work has been done in that direction (Anderson and Richardson, 1982; Burdon and Clark, 2001). Correlations have been shown between nuclear magnetic resonance data and water content and potential in plants (Colire et al., 1988). According to Nagarajan et al. (1993), longitudinal relaxation time (T_1) is the best indicator of the water state, as it furnishes information on both content and availability. The value of transverse relaxation time (T_2) is not generally determined to infer water content but good correlations between T_1 and free water content have been found (McFall et al., 1990). The approach adopted in the present work consisted in ascertaining the content and dynamics of water interactions in cherimoya fruit during ripening using magnetic resonance imaging (MRI) and differential scanning calorimetry (DSC). The term used is the unfreezable water fraction, meaning the amount of water in

a system which does not freeze out as ice at subfreezing temperatures (Wang and Kolbe, 1991). In cryobiology this equates to bound water and is osmotically inactive (Wolfe et al., 2002). DSC has been extensively used to determine the amount of unfreezable water in foodstuffs (Billaderis, 1983) but not as yet in fresh fruit during a developmentally controlled process like ripening.

The progress of ripening is generally defined by the combination of several physicochemical changes. In the case of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) fruit, as for other species of *Annonas*, ethylene production is a late event, and ripening is associated with a sharp early decrease in flesh firmness and a large increase in both soluble solids contents and titratable acidity (Merodio and De La Plaza, 1997). Therefore, the determination of water status in the fruit tissues would be an excellent approach for an integrated analysis of the biochemical and metabolic changes undergone in the course of ripening.

The aim of this work was firstly to determine whether there were variations in the water status of the fruit during ripening, using DSC and MRI, and secondly to determine whether the changes in the content and degree of freedom of water could account for the changes in several specific ripening properties (firmness, titratable acidity and total soluble solids). Also, in the present work the levels of compounds known as osmolites or compatible solutes such as free proline and soluble sugars

* Corresponding author. Tel.: +34 91 5492300; fax: +34 91 5493627.

E-mail address: merodio@if.csic.es (C. Merodio).

¹ Address: Unidad de RMN and Departamento de Química Física II, Facultad de Farmacia, UCM, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain.



Gelatinization and retrogradation of native starch from cherimoya fruit during ripening, using differential scanning calorimetry

O. Goñi, M.I. Escribano, C. Merodio*

Departamento de Ciencia y Tecnología de Productos Vegetales, Instituto del Frío, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, José Antonio Novais, 10. Ciudad Universitaria, 28040-Madrid, Spain

Received 14 September 2006; received in revised form 2 March 2007; accepted 6 March 2007

Abstract

The aim of this work was to determine the physicochemical characteristics of non-conventional starch from cherimoya fruit in order to suggest possible applications of these polymers in various food systems. The influence of the stage of ripening on thermal behaviour of cherimoya fruit starch was also analysed. Starch was visualized by cryo-SEM, and gelatinization and retrogradation properties were studied by differential scanning calorimetry (DSC). DSC was also used for accurate determination of the starch content of cherimoya dry matter. The calorimetric profile for cherimoya fruit starch showed a peak temperature (gelatinization) over a range from 63.7 to 65.2 °C and enthalpy values between 14.8 and 15.9 J g⁻¹ during ripening. Neither temperatures nor melting enthalpy of recrystallized amylopectin differed over the ripening period. The recrystallization rate, as measured by changes in melting enthalpy with time according to the Avrami model, showed a very slight retrograde tendency. It is suggested that these characteristics could be useful in products where good quality and long shelf-life are required.

© 2007 Swiss Society of Food Science and Technology. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cherimoya starch; Differential scanning calorimetry; Gelatinization; Ripening; Retrogradation

1. Introduction

Non-conventional starches have increasingly been gaining in importance in recent years because of their potential application in the development of new products or improvements in traditional uses. In this connection, starches from different tropical and subtropical fruits (Bello-Pérez, Agama-Acevedo, Sánchez-Hernández, & Paredes-López, 1999; Millán-Testa, Méndez-Montealvo, Otthenhof, Farhat, & Bello-Pérez, 2005) have been studied to determine their chemical, physicochemical, and functional properties. Cherimoya (*Annona cherimola* Mill. cv. Fino de Jete) is a subtropical fruit with a very short storage life which has excellent processing possibilities like other edible fruits of the *Annona* genus. Several studies have been published on the starch breakdown and carbohydrate composition of this fruit during ripening (Merodio & de La

Plaza, 1997, references therein). However, there are no reports dealing with the physicochemical and functional characterization of its starch. Starch owes much of its functionality to two major high-molecular-weight carbohydrate components, amylose and amylopectin, as well as to the physical organization of these macromolecules into a granular structure (French, 1984). Amylose molecule consists of a chain of units of glucose linked by $\alpha(1-4)$ glycosidic bonds and is hence an essentially linear molecule, although it is known to contain $\alpha(1-6)$ links in very small proportions (MacAllister, 1979). Amylopectin molecule is also formed by units of glucose, linked by glycosidic bonds in a proportion of 94–96% of $\alpha(1-4)$ in the linear portion and 4–6% of $\alpha(1-6)$ at the branching points (Tufvesson & Eliasson, 2000).

Many different techniques, like X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy or differential scanning calorimetry (DSC), have been used to elucidate the molecular and structural characteristics of starch. Such a destructive technique has been used to

*Corresponding author. Tel.: +34 91 549 2300; fax: +34 91 549 3627.
E-mail address: merodio@ifcsic.es (C. Merodio).

Author's personal copy

Journal of Plant Physiology 166 (2009) 246–258

Available online at www.sciencedirect.comJOURNAL OF
PLANT PHYSIOLOGYwww.elsevier.de/jplph

Regulation of defense and cryoprotective proteins by high levels of CO₂ in *Annona* fruit stored at chilling temperature

Oscar Goñi, María T. Sanchez-Ballesta,
Carmen Merodio, María I. Escribano*

Departamento de Ciencia y Tecnología de Productos Vegetales, Instituto del Frío, IF-CSIC,
José Antonio Novais, 10, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain

Received 30 November 2007; received in revised form 4 April 2008; accepted 8 April 2008

KEYWORDS

Acidic and basic isoenzymes;
Antifungal and cryoprotective activity;
Cherimoya fruit;
Chitinase and 1,3- β -glucanase;
Low temperature-response

Summary

This study focuses on how the length of exposure to chilling temperature and atmosphere storage conditions regulate the hydrolytic activity and expression of chitinase (PR-Q) and 1,3- β -glucanase (PR-2) isoenzymes in cherimoyas (*Annona cherimola* Mill.). Storage at 6 °C modified the expression of constitutive isoenzymes and induced the appearance of novel acidic chitinases, AChi26 and AChi24, at the onset of the storage period, and of a basic chitinase, BChi33, after prolonged storage. The induction of this basic isoenzyme was concomitant with the accumulation of basic constitutive 1,3- β -glucanases. These low-temperature-induced chitinases modified the growth inhibition *in vitro* of *Botrytis cinerea*. Short-term high CO₂ treatment activated a coordinated response of acidic chitinases and 1,3- β -glucanases after prolonged storage at chilling temperature. Moreover, the high *in vitro* cryoprotective activity of CO₂-treated protein extracts was associated with the induction of two low molecular mass isoenzymes, AGLu19 and BChi14. Thus, exposure to high concentrations of CO₂ modified the response of fruit to low temperature, inducing the synthesis of cryoprotectant proteins such as specific pathogenesis-related isoenzymes that could be functionally associated with an increase in chilling tolerance *in vivo*.

© 2008 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Abbreviations: FW, fresh weight; LDH, lactate dehydrogenase; PDA, potato dextrose agar; PR, pathogenesis-related.

*Corresponding author. Tel.: +34915492300;

fax: +34915493627.

E-mail address: escribano@if.csic.es (M.I. Escribano).

Introduction

The survival of plants in a changing environment requires metabolic responses to external stimuli,

0176-1617/\$ - see front matter © 2008 Elsevier GmbH. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jplph.2008.04.005



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Postharvest Biology and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/postharvbioRipening-related defense proteins in *Annona* fruit

Oscar Goñi, María T. Sanchez-Ballesta, Carmen Merodio, María I. Escribano*

Departamento de Ciencia y Tecnología de Productos Vegetales, Instituto del Frío, IF-CSIC, José Antonio Novais, 10, Ciudad Universitaria, E-28040, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 July 2009

Accepted 1 November 2009

Keywords:

Acidic and basic isoenzymes

Cherimoya fruit

Chitinase and 1,3- β -glucanase

Defense-related proteins

Hydrolytic and antifungal activity

Ripening

ABSTRACT

In order to obtain a better understanding of the active defense strategy of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) fruit, hydrolytic and antifungal activity, as well as expression of proteins functionally and immunogenically related to the pathogenesis-related proteins chitinase (PR-Q) and 1,3- β -glucanase (PR-2), were estimated in fruit at different ripening stages. Increase in expression of the 27 kDa constitutive chitinase and the induction of two new proteins, a 26 kDa chitinase and a 51 kDa 1,3- β -glucanase were associated with enhanced *in vitro* hydrolytic and antifungal activity of the acidic protein extract in ripe fruit. Ripening modified the expression of constitutive basic isoenzymes, with a sharp decrease in both relative accumulation and hydrolytic activity. Likewise, a new basic 33 kDa chitinase was induced in the over-ripe fruit, concomitant with accumulation of a basic constitutive 76 kDa 1,3- β -glucanase. At this stage, the basic protein extract modified *in vitro* growth inhibition of *Botrytis cinerea*. Short-term high CO₂ treatment delayed fruit ripening and maintained a similar distribution of activity and isoenzymatic pattern in both protein fractions to that in unripe fruit. These results indicate that the changes in the pattern of defense proteins and hydrolytic activity in cherimoyas appear to be associated with ripening. Moreover, unlike the constitutively expressed isoenzymes, only the transiently induced chitinases and 1,3- β -glucanases were associated with an active defense-related response.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chitinases (PR-Q) and 1,3- β -glucanases (PR-2) are the most widely studied and well-characterized defense-related proteins in plants. Their expression is regulated by plant hormones and both enzymes are strongly induced when plants respond to wound or infection by fungal, bacterial or viral pathogens. Moreover, there is compelling evidence that chitinases and 1,3- β -glucanases, either alone or more particularly acting in combination, contribute to plant defense against pathogen infection. In naturally induced defenses such as the hypersensitive reaction, hydrolases are strongly and rapidly induced and operate in two successive lines: a first line of extracellularly targeted enzymes and a second line of the vacuolar and very active enzymes (for review, see Stintzi et al., 1993; Leubner-Metzger and Meins, 1999; Kasprzewska, 2003).

During the senescence of plant organs and postharvest, natural resistance to different pathogens generally declines, increasing the risk of infection, disease and ultimately death. In this sense, fruit ripening is eventually associated with the breakdown of cell structures and with important changes in cell wall composition, leading to fruit softening and accumulation of sugars and other nutrients,

which makes them an ideal target for pathogens. Although a complex pattern of constitutive chitinases and 1,3- β -glucanases has been observed in some healthy fruit tissues (McCollum et al., 1997 and references therein; Goñi et al., 2009), little is known about the developmental accumulation of these defense proteins and their physiological role during ripening. The function of chitinase and 1,3- β -glucanase in fruit tissues has received little attention, although they have been proposed to fulfill a physiological function in some cases, participating in cell wall degradation that leads to fruit softening or protein storage (Clendennen et al., 1998; Peumans et al., 2000). In this respect, it is necessary to study whether these defense proteins act as antifungal agents, complying with the same rules of natural defense induction during fruit ripening.

In this study, we set out to establish the pattern of basic and acidic chitinase and 1,3- β -glucanase isoenzyme expression during cherimoya ripening, as well as to associate the patterns of defense-related proteins with the changes in hydrolytic and antifungal activity. Because short-term treatment with high CO₂ has previously been shown to suppress cherimoya ripening-associated changes, such as autocatalytic ethylene production, cell wall degrading enzymes and lignin degradation (Muñoz et al., 1999; Assis et al., 2001), we also studied isoenzyme expression in CO₂-treated fruit to assess whether the pattern of defense protein expression and functionality are associated with the ripening process.

* Corresponding author. Tel.: +34 91 5492300; fax: +34 91 5493627.
E-mail address: escribano@if.csic.es (M.I. Escribano).

**Potent cryoprotective activity of cold and CO₂-regulated cherimoya (*Annona cherimola*)
endochitinase¹**

Oscar Goñi, María T. Sanchez-Ballesta, Carmen Merodio, María I. Escribano*

*Departamento de Ciencia y Tecnología de Productos Vegetales, Instituto del Frío, IF-ICTAN
(CSIC), José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain.*

*Corresponding author. Tel.: +34 91 5492300; fax: +34 91 5493627

E-mail address: escribano@if.csic.es (María I. Escribano)

¹ Spanish patent P200801914



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD

P200801914

'08 JUN 26 12:24

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN CÓDIGO
MADRID 28

(1) MODALIDAD <input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCION <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD		(3) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN: MODALIDAD NUMERO SOLICITUD FECHA SOLICITUD	
(2) TIPO DE SOLICITUD <input type="checkbox"/> ADICIÓN A LA PATENTE <input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL <input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD <input type="checkbox"/> TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA <input type="checkbox"/> PCT: ENTRADA FASE NACIONAL			
(5) SOLICITANTE(S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)		NOMBRE	
		NACIONALIDAD Española	
		CÓDIGO PAIS ES	
		DNI/CIF Q2818002D	
		CNAE PYME	
(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE DOMICILIO C/ Serrano, 117 LOCALIDAD Madrid PROVINCIA Madrid PAIS RESIDENCIA España NACIONALIDAD Española		TELEFONO FAX CORREO ELECTRONICO CÓDIGO POSTAL 28006 CÓDIGO PAIS ES CÓDIGO NACION ES	
(7) INVENTOR (ES): Escribano Garaizabal Merodio Moreno Goñi Ramos		APELLIDOS NOMBRE NACIONALIDAD CÓDIGO PAIS Española Española Española ES ES ES	
(8) <input type="checkbox"/> EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR <input checked="" type="checkbox"/> EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR		(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: <input checked="" type="checkbox"/> INVEN. LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESIÓN	
(10) TÍTULO DE LA INVENCION PROTEÍNA CRIOPROTECTORA CON ACTIVIDAD QUITINASA A BAJAS TEMPERATURAS, PROCEDIMIENTO PARA SU OBTENCIÓN Y SUS APLICACIONES			
(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA: <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO			
(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR FECHA			
(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD: PAIS DE ORIGEN		CÓDIGO PAIS	NUMERO
			FECHA
(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES <input type="checkbox"/>			
(15) AGENTE/REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLENSE ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES) PONS ARIÑO, ANGEL, 04995, Gta. de Rubén Darío, 4, MADRID, MADRID, 28010, ESPAÑA			
(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN: <input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCIÓN. Nº DE PÁGINAS: 29 <input checked="" type="checkbox"/> Nº DE REIVINDICACIONES: 13 <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS: 2 <input type="checkbox"/> LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS: 0 <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD		<input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN <input checked="" type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS DE SOLICITUD <input type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA <input type="checkbox"/> PRUEBAS DE LOS DIBUJOS <input type="checkbox"/> CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN <input checked="" type="checkbox"/> OTROS: Poder general 20081765	
NOTIFICACIÓN DE PAGO DE LA TASA DE CONCESIÓN: Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986		FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE ANGEL PONS ARIÑO (VER COMUNICACIÓN) FIRMA DEL FUNCIONARIO	

MOD. 31011 - 2 - RECIBO SOLICITANTE

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO

SRA. DIRECTORA DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

informacion@oepm.es
www.oepm.es

Pº Castellana, 75 - 28071 MADRID



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD

P200801931

08 JUN 27 12:31

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN

CÓDIGO

MADRID

28

(1) MODALIDAD

☒ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD

☐ ADICIÓN A LA PATENTE

☐ SOLICITUD DIVISIONAL

☐ CAMBIO DE MODALIDAD

☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA

☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN:
MODALIDAD

NUMERO SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

(5) SOLICITANTE(S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL
Consejo Superior de
Investigaciones Científicas (CSIC)

NOMBRE

NACIONALIDAD

Española

CÓDIGO PAIS

ES

DNICIF

Q2818002D

CNAE PYME

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE

DOMICILIO C/ Serrano, 117

LOCALIDAD Madrid

PROVINCIA Madrid

PAIS RESIDENCIA España

NACIONALIDAD Española

TELEFONO

FAX

CORREO ELECTRONICO

CÓDIGO POSTAL 28006

CÓDIGO PAIS ES

CÓDIGO NACION ES

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO PAIS

Escribano Garaizabal

María Isabel

Española

ES

Merodio Moreno

Carmen

Española

ES

Gofri Ramos

Óscar

Española

ES

(8)

☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☒ INVENC. LABORAL

☐ CONTRATO

☐ SUCESIÓN

(9) TÍTULO DE LA INVENCION

PROTEÍNA CRIOPROTECTORA CON ACTIVIDAD 1-3 B-GLUCANASA A BAJAS TEMPERATURAS, PROCEDIMIENTO PARA SU OBTENCIÓN Y SUS APLICACIONES

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI

☐ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:
PAIS DE ORIGEN

CÓDIGO PAIS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES ☐

(15) AGENTE/REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLENSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

PONS ARIÑO, ANGEL, 04995, Gta. de Rubén Darío, 4, MADRID, MADRID, 28010, ESPAÑA

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

☒ DESCRIPCIÓN. Nº DE PÁGINAS: 31

☒ Nº DE REIVINDICACIONES: 14

☒ DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS: 2

☐ LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS: 0

☒ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN

☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS DE SOLICITUD

☐ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN

☒ OTROS: Poder general 20081765

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

ANGEL PONS ARIÑO

(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN DE PAGO DE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión: para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986

SRA. DIRECTORA DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

informacion@oepm.es
www.oepm.es

Pº Castellana, 75 - 28071 MADRID

MOD. 30011 - 2 - PAGO SOLICITANTE

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P200930266	
Fecha de recepción:	04 junio 2009, 17:27 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	ES1641.414	
Solicitante:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)	
Número de solicitantes:	1	
País:	ES	
Título:	ENDOQUITINASA ÁCIDA ACTIVA A BAJAS TEMPERATURAS, PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y USOS	
Documentos enviados:	Descripción.pdf (32 p.) Reivindicaciones-1.pdf (5 p.) Dibujos-1.pdf (2 p.) Resumen-1.pdf (1 p.) FEERCPT-1.pdf (1 p.) SEQLPDF.pdf (2 p.) SEQLTXT.txt	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=ENTIDAD PONS CONSULTORES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL SA - CIF A28750891 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J,OU=703015345,OU=fnmt clase 2 ca,O=FNMT,C=es	
Fecha y hora de recepción:	04 junio 2009, 17:27 (CEST)	
Codificación del envío:	D1:AE:6B:4A:80:CD:10:81:F5:F0:5E:20:05:F1:74:0D:1E:85:40:C5	

/Madrid, Oficina Receptora/

